

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 427**

51 Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2014 PCT/EP2014/002386**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15032494**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2014 E 14761579 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024 EP 3041345**

54 Título: **Planta resistente a *Helminthosporium turcicum***

30 Prioridad:

04.09.2013 DE 102013014637
24.04.2014 DE 102014005823

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
14.11.2024

73 Titular/es:

KWS SAAT SE & CO. KGAA (50.0%)
Grimsehlstraße 31
37574 Einbeck, DE y
UNIVERSITÄT ZÜRICH (50.0%)

72 Inventor/es:

OUZUNOVA, MILENA;
SCHEUERMANN, DANIELA;
KELLER, BEAT;
KRATTINGER, SIMON;
WICKER, THOMAS;
HERREN, GERHARD;
BENDER, SEVERINE;
KESSEL, BETTINA;
PRESTERL, THOMAS y
KNAAK, CARSTEN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 2 987 427 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

Planta resistente a *Helminthosporium turcicum*

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la modificación de plantas mediante procedimientos biológicos moleculares y tecnología de marcadores e ingeniería genética. Se refiere a una nueva planta resistente a *Helminthosporium turcicum*, en particular a una planta de maíz que comprende un polinucleótido con uno o más genes que proporcionan resistencia en un fragmento cromosómico modificado de la accesión Pepitilla, así como a una célula, a un tejido, a una parte, grano y semilla de la misma. Se describe además un polinucleótido aislado que comprende uno o más genes que proporcionan resistencia frente a *Helminthosporium turcicum*, un vector, una célula vegetal transgénica y una planta transgénica que contiene dicho polinucleótido. Además, también se describen marcadores moleculares adecuados y su uso para introducir el locus de resistencia o el transgén en una planta, así como la identificación de plantas de maíz mejoradas que comprenden un fragmento cromosómico modificado.

Antecedentes de la invención

En el maíz (*Zea mays* L.) se encuentra un gran número de hongos patógenos que causan enfermedades foliares. El hongo que puede causar, de lejos, el mayor daño en condiciones climáticas tropicales, pero también templadas, como las que prevalecen en grandes partes de Europa y Norteamérica, pero también en África y la India, se conoce como *Helminthosporium turcicum* o, como sinónimos, también *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard et Suggs (teleomorfo: *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard & Suggs). *H. turcicum* es el agente causal de la enfermedad de la mancha foliar «tizón de la hoja del maíz del norte» (NCLB, Northern Corn Leaf Blight), que puede ser muy perjudicial como epidemia para las variedades de maíz susceptibles en años húmedos, provocando considerables pérdidas de rendimiento del 30% y más en grandes áreas (Perkins & Pedersen, 1987; Raymundo & Hooker, 1981a; Ullstrup & Miles, 1957). Por ello, desde los años 1970s se busca material genético para encontrar resistencias naturales. Hoy en día se conocen resistencias cuantitativas y cualitativas. Mientras que la resistencia cuantitativa heredada oligo- o poligénicamente aparece incompleta e inespecífica de raza en el fenotipo y está influenciada por genes adicionales y parcialmente dominantes, la resistencia cualitativa es típicamente específica de raza y puede ser heredada a través de genes individuales, mayoritariamente dominantes como *Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, *Htm1* o *Htn1* (Lipps *et al.*, 1997; Welz & Geiger, 2000). Mediante retrocruzamiento se logró la introgresión de los genes *Ht* en numerosas líneas de maíz endogámicas de uso frecuente, como W22, A619, B37 o B73, en las que mostraron dominancia y expresión parciales en función del respectivo fondo genético (Welz, 1998).

A pesar de esta compleja arquitectura genética de la resistencia a NCLB en maíz, el uso del gen *Ht1* en maíz junto con la resistencia cuantitativa parcial ha sido hasta ahora particularmente suficiente para controlar la helmintosporiosis (Welz, 1998). Esto se debe a que la raza 0 de *H. turcicum* es, de lejos, la predominante en todo el mundo, representando aproximadamente el 55% (Lipps *et al.*, 1997; Ferguson & Carson, 2007), mientras que otras razas como la 2N y la 23N, por el contrario, son muy raras y a menudo están restringidas geográficamente (Moghaddam & Pataky, 1994; Jordan *et al.*, 1983; Lipps & Hite, 1982; Thakur *et al.*, 1989; Welz, 1998). En comparación con una planta de maíz con *Ht1* esta raza 0 es avirulenta, por lo que muestra suficiente resistencia global a NCLB cuando se le proporciona la resistencia cuantitativa adecuada. Sin embargo, numerosos estudios informan de una creciente propagación de las razas menos comunes (Jordan *et al.*, 1983; Welz, 1998; Pratt & Gordon, 2006). Las razones de esto residen en la dinámica de población de un patógeno, que permite cambios en la virulencia del patógeno a través de nuevas mutaciones en genes de avirulencia y nuevas combinaciones de genes de virulencia existentes. En última instancia, esto puede conducir a la aparición de nuevas razas patógenas adaptadas y, en ocasiones, más agresivas. En Brasil, por ejemplo, la población de *H. turcicum* ya parece ser significativamente más diversa en términos de composición racial que en Norteamérica, por ejemplo. Gianasi *et al.* (1996) informan sobre razas de *H. turcicum* que ya han quebrantado la resistencia conferida por el gen *Ht1*. A esto hay que añadir la inestabilidad de los genes de resistencia frente a determinados factores ambientales como la temperatura y la intensidad luminosa en algunas zonas climáticas (Thakur *et al.*, 1989). Como resultado de este desarrollo, visto globalmente, el uso de genes de resistencia *Ht* que han recibido menos atención hasta la fecha o de genes nuevos para la producción de plantas comerciales de maíz está cobrando cada vez más importancia para lograr el objetivo de una resistencia amplia y duradera frente a *H. turcicum* en el maíz. Pataky *et al.* ya presentaron en 1998 los primeros enfoques al respecto. Utilizando una combinación de *Ht1* y *Htn1*, se pudo mejorar la resistencia a NCLB en maíz de grano de élite *sh2*.

Un origen de la resistencia monogénica *Htn1* es la variedad local mexicana 'Pepitilla' (Gevers, 1975). Las líneas de introgresión *Htn1* muestran un mapeo del gen en el brazo largo del cromosoma 8 aproximadamente 10 cM distal a *Ht2* y 0,8 cM distal al marcador RFLP umc117 (bin 8.06) (Simcox & Bennetzen, 1993). A diferencia de los otros genes de resistencia *Ht*, *Htn1* proporciona resistencia retrasando el inicio de la esporulación y, por tanto, contrarrestando el desarrollo de lesiones. Como resultado, se producen menos lesiones y más pequeñas

y se reducen las zonas de esporulación (Raymundo *et al.*, 1981b, Simcox & Bennetzen, 1993). No se forman lesiones clorótico-necróticas, como las que se producen con la resistencia proporcionada por *Ht1*, *Ht2* o *Ht3* (Gevers, 1975). Sin embargo, la reacción de resistencia en el estado heterocigoto del gen *Htn1* es significativamente menos efectiva que en el estado homocigoto (Raymundo *et al.*, 1981 b).

- 5 La manejabilidad mejorada de cría del gen *Htn1* requiere el desarrollo de marcadores específicos adicionales para simplificar aún más la determinación del genotipo. La tecnología MAS (marker assisted-selection o selección asistida por marcadores) permite entonces un «apilamiento» o «piramidación» eficiente de varios genes de resistencia (Min *et al.*, 2012). En muchos estudios, se utilizaron las líneas de introgresión *B37Htn1* o *W22Htn1* para mapear el locus de resistencia e identificar la fuente de resistencia (Raymundo *et al.*, 1981a, b; 10 Simcox & Bennetzen, 1993, Bar-Zur *et al.*, 1998; Coates & White, 1998). Sin embargo, la información sobre los marcadores que podrían utilizarse para seleccionar el locus de resistencia para *Htn1* de la accesión Pepitilla es limitada (Simcox & Bennetzen, 1993). Los marcadores conocidos para *Htn1* funcionales y que flanquean el locus de resistencia de la accesión de Pepitilla siguen mapeados con una separación de aproximadamente 22,2 cM, lo que en el mejor de los casos permite la selección de un gran fragmento cromosómico. Sin embargo, 15 a menudo existe el riesgo de doble recombinación genética dentro de este fragmento entre los marcadores, lo que podría dar lugar a una selección falsamente positiva para el locus de resistencia *Htn1*. Además, en algunos casos, cuanto mayor sea el fragmento cromosómico introgresado, mayor será la probabilidad de que se adopten regiones genéticas indeseables en una línea de introgresión y se lleven a través de generaciones de líneas de élite. Tales regiones genéticas, especialmente si están estrechamente ligadas al locus *Htn1* y 20 conducen a efectos claramente negativos sobre uno o más rasgos agronómicos, se denominan Linkage Drag o arrastre de enlace. Sin embargo, tales efectos negativos no se conocen a partir de estudios conocidos que hayan investigado y utilizado líneas de introgresión con *Htn1* de Pepitilla. El muy extenso trabajo de investigación de Welz (1998), que también se llevó a cabo en *B37Htn1*, entre otros, también postula que no se pueden resolver las desventajas significativas con respecto al rendimiento y la madurez, por ejemplo, como resultado de la introgresión del locus *Htn1*. Por lo tanto, no se encuentran esfuerzos serios en el estado de la 25 técnica para acortar aún más el gran fragmento cromosómico de una manera dirigida.

- Por el contrario, el documento WO 2011/163590 divulga el genotipo PH99N como fuente alternativa de resistencia a NCLB en el cromosoma 8 bin 5, que no corresponde a la accesión Pepitilla. Para las poblaciones retrocruzadas producidas a partir de PH99N, esencialmente solo se identificó resistencia frente a las razas 0 y 30 1 de *H. turcicum*. Tampoco se determinó claramente el fenotipo de resistencia. No obstante, los autores concluyen que la resistencia se debe al gen *Htn1*. Aunque fue posible restringir el locus de resistencia para PH99N a un fragmento cromosómico de solo -224 kb de longitud, no se divulgó una planta de maíz resistente con el fragmento de 224 kb y, por tanto, con el supuesto *Htn1*. Además, el genotipo PH99N no se ha puesto a disposición del público mediante depósito.

- 35 Un enfoque alternativo para el aprovechamiento del gen *Htn1* es la identificación y clonación del gen de resistencia y su uso en un enfoque transgénico.

- Con la intención de identificar los genes de resistencia para NCLB, Chung *et al.* publicaron un estudio en 2010 para mapear con precisión el locus de resistencia bin 8.06. Sin embargo, el fragmento cromosómico analizado no procedía de Pepitilla, sino del híbrido de maíz DK888, que presenta resistencia a múltiples enfermedades. 40 Los estudios de especificidad racial de *Helminthosporium* sugirieron inicialmente que el locus de resistencia en DK888, designado como *qNLB8.06_{DK888}*, está estrechamente vinculado o funcionalmente ligado a los genes *Ht2* y *Htn1*, ya que las cepas 23 y 23N de *Helminthosporium* eran virulentas (Chung *et al.*, 2008). Sin embargo, no se obtuvieron pruebas definitivas de la presencia de *Htn1* en ausencia de un aislado N puro de *H. turcicum*. Además, el fenotipo de resistencia con *qNLB8.06_{DK888}* no se correspondía con el fenotipo esperado en cuanto al desarrollo de lesiones cloróticas y al retraso en la formación de lesiones. Otros estudios de complementación en Chung *et al.* (2010) mostraron finalmente que *qNLB8.06_{DK888}* es idéntico, alélico, estrechamente ligado o funcionalmente ligado a *Ht2*, pero no a *Htn1*. El locus de resistencia *qNLB8.06_{DK888}* pudo asignarse a un 45 fragmento cromosómico de 0,46 Mb. Las anotaciones genómicas de este fragmento cromosómico indicaron 12 marcos de lectura abiertos putativos, tres de los cuales podrían representar cada uno un gen tipo proteína quinasa en tándem (GRMZM2G135202; GRMZM2G164612) o un gen similar a proteína fosfatasa (GRMZM2G119720) y cada uno es igualmente favorecido como un prometedor gen candidato para el gen de resistencia *Ht2* (Chung *et al.*, 2010). No se describen pruebas funcionales.

- Además, el documento WO 2011/163590 A1 también anota el supuesto gen *Htn1* en la fuente de resistencia PH99N como un gen similar a una proteína quinasa en tándem (GRMZM2G451147) y divulga su secuencia 55 genética, pero tampoco demuestra su funcionalidad, por ejemplo, en una planta de maíz transgénica.

Resumen de la invención

La presente invención se realizó en el contexto del estado de la técnica descrito anteriormente, en cuyo caso el objetivo de la presente invención es proporcionar una planta de maíz que tenga resistencia frente al patógeno

Helminthosporium turcicum a partir del donante Pepitilla y que sea superior en términos de características agronómicas a las plantas de maíz conocidas con resistencia a partir del donante Pepitilla.

El objetivo se logra, por una parte, mediante una planta de maíz en cuyo genoma se integra un fragmento cromosómico del donante Pepitilla, y el fragmento cromosómico comprende un intervalo del donante (en lo sucesivo denominado primer intervalo o intervalo 1) que muestra alelos del donante de acuerdo con el haplotipo según la Tabla 2 y tiene un polinucleótido que imparte resistencia a *Helminthosporium turcicum* en la planta de maíz, y el fragmento cromosómico no contiene otro intervalo del donante (en lo sucesivo denominado segundo intervalo o intervalo 2) entre un marcador en una primera región marcadora (M1) flanqueada por los marcadores SYN14136 y PZE-108076510 y un marcador en una segunda región marcadora (M2) flanqueada por los marcadores SYN24931 y PZE-108077560. Ésta y otras soluciones alternativas al problema que se describen a continuación pueden basarse en un programa de cultivo para integrar el locus *Htn1* de Pepitilla en líneas de maíz. Sin embargo, opcionalmente también se pueden utilizar enfoques de ingeniería genética para producir plantas de la presente invención. A manera de ejemplo más adelante se describen con más detalle enfoques de ingeniería genética. Pueden utilizarse diversos genotipos del estado de la técnica para producir las plantas de la presente invención. En particular, B37HTN1, que tiene el locus de resistencia de la variedad autóctona «Pepitilla», se utilizó como línea de partida. Además de la propia Pepitilla y de B37HTN1 (también conocido en la técnica anterior como B37HtN), casi cualquier genotipo de maíz conocido en cuyo genoma, en particular en el cromosoma 8 bin 5 o 6, se haya insertado una introgresión del locus de resistencia *HTN1* de Pepitilla puede utilizarse para integrar el locus *HTN1* para la producción de una planta de maíz según la invención. En el estado de la técnica se conocen numerosos ejemplos de genotipos, por ejemplo, W22HtN (por ejemplo, Bar-Zur *et al.*, 1998); H6314HtN (por ejemplo, Bar-Zur *et al.*, 1998), B73HtN (por ejemplo, Shimon *et al.*, Journal of Phytopathology 131:4 (1991), 315-321), B68HtN y A632HtN (por ejemplo, Carson, Plant Disease 79 (1995), 717-720) y A619HtN (por ejemplo, Stanković *et al.*, Genetika 39:2 (2007), 227 -240). En una planta de maíz según la invención, el fragmento cromosómico se origina a partir del donante Pepitilla, en una configuración preferida de la planta de maíz según la invención, el fragmento cromosómico se origina a partir del donante B37HTN1 u otro genotipo de maíz mencionado anteriormente. B37HTN1 puede solicitarse, por ejemplo, al Centro de Stock COOP de Genética del Maíz con el ID de stock 65749.

El fragmento cromosómico integrado en el genoma de la planta de maíz según la invención proviene del donante Pepitilla, que se sabe que tiene el locus de resistencia HTN1. La introgresión de este locus de resistencia se localiza en el brazo largo del cromosoma 8, bin 8.05 - 8.06. El fragmento cromosómico integrado comprende el primer intervalo del donante, que tiene un polinucleótido que proporciona resistencia a *Helminthosporium turcicum* en la planta de maíz según la invención. El polinucleótido comprende uno o más genes que proporcionan resistencia del locus HTN1 de Pepitilla (Tabla 1) o alelos de genes del mismo. El gen o alelo del gen puede causar un fenotipo de resistencia con las características típicas de HTN1 en condiciones de infestación con *H. turcicum*. Preferentemente, el polinucleótido comprende uno o más genes que proporcionan resistencia del locus HTN1 preferentemente de Pepitilla seleccionados de RLK1 y EXT1 (véase la Tabla 1) o alelos de genes de los mismos, que causan un fenotipo de resistencia con las características HTN1-típicas en condiciones de infestación con *H. turcicum*. Particularmente preferente, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido según SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 6 o un homólogo de un polipéptido según SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 6, que en condiciones de infestación con *H. turcicum* causa un fenotipo de resistencia con las características HTN1-típicas. Estas características típicas de HTN1 incluyen, por ejemplo, retraso en el inicio de la esporulación, desarrollo reducido de lesiones, desarrollo de lesiones más pequeñas, zonas de esporulación reducidas y/o ausencia de lesiones cloróticas-necróticas o solo aisladas. Estructuralmente, el polinucleótido se caracteriza porque comprende una molécula de ácido nucleico (a) que tiene una secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, (b) que tiene una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una de las secuencias de nucleótidos según SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 preferentemente en toda la longitud de la secuencia, (c) que se hibrida con la cadena complementaria de una molécula de ácido nucleico según (a) o (b) en condiciones estrictas, (d) que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16, (e) que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a una de las secuencias de aminoácidos según (d), o (f) que tiene una secuencia parcial de un ácido nucleico según (a) a (e). En una configuración preferida, el polinucleótido se caracteriza porque comprende una molécula de ácido nucleico (aa) que tiene una secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1 o 5, (bb) que tiene una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una de las secuencias de nucleótidos según SEQ ID NO: 1 o 5, preferentemente en toda la longitud de la secuencia, (cc) que se hibrida con la cadena complementaria de una molécula de ácido nucleico según (aa) o (bb) en condiciones estrictas, (dd) que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 o 6, (ee) que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a una de las secuencias de aminoácidos según (dd), o (ff) que tiene una secuencia parcial de un ácido nucleico según (aa) a (ee). Una secuencia parcial de una molécula de ácido nucleico en el sentido de la presente invención puede comprender al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o al menos 100 nucleótidos consecutivos, comprender además al menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000

nucleótidos consecutivos. El polinucleótido puede estar presente en estado heterocigótico u homocigótico en el genoma de la planta de maíz según la invención; preferentemente, el polinucleótido está presente en estado homocigótico.

- 5 Tabla 1: Genes potenciales que proporcionan resistencia del locus HTN1 de Pepitilla; nombre del gen (columna 1); referencia a SEQ ID NO correspondientes de la secuencia de exones genómicos (columna 2); referencia a SEQ ID NO correspondientes de la secuencia de aminoácidos/proteínas predicha (columna 3); gen homólogo anotado del genoma de referencia B73 (columna 4).

Nombre de gen	ADNc SEQ ID NO:	Secuencia proteica SEQ ID NO:	Gen homólogo B73
RLK1	1	2	GRMZM2G451147
RLK4	3	4	GRMZM2G144028
EXT1	5	6	GRMZM2G445338
DUF1	7	8	AC209075.3_FG007
ZNF1	9	10	GRMZM2G175661
CYT1	11	12	GRMZM2G092018
RET1	13	14	GRMZM2G091973
HYD	15	16	GRMZM2G144021

- Además, el primer intervalo en el fragmento cromosómico, que muestra alelos donantes de acuerdo con el haplotipo según la Tabla 2, se caracteriza por la secuencia de alelos donantes de acuerdo con el haplotipo según la Tabla 2, pero no se limita a esta secuencia de alelos donantes de acuerdo con el haplotipo según la Tabla 2. Esto significa que el primer intervalo muestra al menos el alelo donante que describe el gen que proporciona resistencia de la Tabla 1, opcionalmente con el alelo donante del marcador MA0008. Además, el primer intervalo muestra preferentemente al menos los alelos donantes de acuerdo con el haplotipo según la Tabla 2 de MA0021 a MA0022 (es decir, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022) o de MA0005 a MA0022 (es decir, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012 y MA0022) o de MA0005 a MA0013 (es decir, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012 y MA0013) o bien de MA0005 a MA0014 (es decir, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013 y MA0014) o bien de MA0005 a MA0015 (es decir, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014 y MA0015) o de MA0005 a MA0016 (es decir, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015 y MA0016), en particular preferentemente de MA0005 a MA0017 (es decir, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016 y MA0017), MA0005 a MA0018 (es decir, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017 y MA0018), MA0005 a PZE-108095998 (es decir MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018 y PZE-108095998), MA0005 a PZE-108096011 (es decir, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998 y PZE-108096011) o MA0005 a MA0019 (es decir MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011 y MA0019), muy particularmente preferible de MA0005 a PZE-108096610 (es decir MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019 y PZE-108096610), MA0005 a MA0020 (es decir, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-108096610 y MA0020), MA0005 a PZE-108096791 (es decir, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-108096610, MA0020 y PZE-108096791) o MA0005 a MA0006 (es decir, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-108096610, MA0020, PZE-108096791 y MA0006). Este haplotipo resistente permite una clara especificación e identificación de la fuente de resistencia Pepitilla. En particular, el primer intervalo se localiza entre los marcadores MA0004 y PZE-108097482, entre los marcadores MA0004 y MA0022, entre los marcadores MA0005 y PZE-108097482 o entre los marcadores MA0005 y MA0022. Preferiblemente, el primer intervalo describe una sección del fragmento cromosómico que puede proporcionar la resistencia HTN1-típica. Como tal, es portador del polinucleótido mencionado anteriormente.

Tabla 2: Haplotipo resistente de B37HTN1;

Posición en pb en B73 AGPv02	Donante del alelo B37HTN1	Designación del marcador
151831049	C	MA0005
151907173	G	MA0021
152045106	T	MA0007
152045141	T	MA0008
152045402	T	MA0009
152045516	C	MA0010
152045912	T	MA0011
152046502	T	MA0012
152046529	A	MA0022
152133057	G	MA0013
152133380	A	MA0014
152144310	A	MA0015
152250992	A	MA0016
152301656	A	MA0017
152304127	A	MA0018
152433358	A	PZE-108095998
152435855	A	PZE-108096011
152630794	C	MA0019
152703579	G	PZE-108096610
152753635	A	MA0020
152887338	G	PZE-108096791
152888374	A	MA0006

Además, cada planta de maíz según la invención es una planta de maíz resistente a Ht. La resistencia a Ht proporcionada por la integración del fragmento cromosómico puede cuantificarse determinando notas de evaluación en experimentos de fenotipado según el esquema mostrado en la Tabla 3 y el Ejemplo 1. A), en cuyo caso el nivel de resistencia disminuye de 1 a 9. Las plantas de maíz resistentes a Ht según la invención muestran un aumento de la resistencia a *H. turcicum* de al menos 1 nota de evaluación, preferentemente de al menos 2 notas de evaluación o al menos 3 notas de evaluación y particularmente preferible de al menos 4 notas de evaluación. Preferentemente, una planta de maíz según la invención muestra resistencia a al menos una raza de *Helmithosporium turcicum*, que no corresponde a la especificidad de raza conocida del estado de la técnica. En una forma de realización particularmente preferida, una planta de maíz según la invención puede ser resistente a todas las razas conocidas de *Helmithosporium turcicum*, es decir, la resistencia impartida no es específica de raza y puede ser particularmente ventajosa para el desarrollo de una resistencia amplia a *Helmithosporium turcicum*.

Tabla 3: Esquema de notas de evaluación para experimentos de fenotipado en ensayos de campo en diferentes localizaciones con inoculación natural y artificial de *H. turcicum* (según el Comité Alemán del Maíz (DMK); AG Sortenwesen 27.02.02; (DMK J. Rath; RP Freiburg H.J. Imgraben)

Nota de evaluación	Fenotipo
1	Las plantas no muestran síntomas de enfermedad 0%.
2	Inicio de la infestación, primeras manchas pequeñas (menores de 2 cm) visibles. Menos del 5% de la superficie foliar está afectada.
3	Algunas manchas se han desarrollado en una capa de la hoja. Entre el 5 y el 10% de la superficie foliar está afectada.
4	El 10-20% de la superficie foliar está afectada. Manchas importantes en varias capas de la hoja.
5	El 20-40% de la superficie de la hoja se ve afectada. Las manchas comienzan a fusionarse.
6	El 40-60% de la superficie foliar está afectada. Infestación sistemática visible en las hojas.
7	El 60-80% de la superficie foliar se ve afectada. Aproximadamente la mitad de las hojas se destruyen o se secan debido al ataque de hongos.
8	El 80-90% de la superficie foliar se ve afectada. Más de la mitad de las hojas se destruyen o se secan debido a la infestación fúngica.

Nota de evaluación	Fenotipo
9	El 90-100% de la superficie foliar se ve afectada. Las plantas se secan casi por completo.

La descripción revela la estructura genética o molecular del locus HTN1 mediante la especificación de un haplotipo, la cartografía de marcadores prominentes y la identificación de genes candidatos para conferir resistencia frente al patógeno *Helminthosporium turcicum*.

- 5 Sorprendentemente, la planta de maíz según la invención demostró ser agronómicamente superior en experimentos de genotipado y fenotipado en campo e invernadero. Esto se debe a que, mientras que otras líneas convertidas procedentes de un programa de cultivo para integrar el locus HTN1 de Pepitilla y líneas convertidas conocidas en el estado de la técnica como B37HTN1 muestran, además de la resistencia mediada por Ht en condiciones no infestadas con *H. turcicum* y en condiciones ambientales comparables (temperatura, suministro de nutrientes, ubicación, etc.), un retraso significativo en el momento de la floración masculina y/o
- 10 femenina en comparación con la línea correspondiente sin introgresión (por ejemplo, línea isogénica o línea de partida), en el caso de la planta de maíz según la invención, el tiempo de floración corresponde al de una planta de maíz isogénica de referencia en cuyo genoma no está integrado un fragmento cromosómico de la Pepitilla donante. Los tiempos de floración se corresponden entre sí si difieren en menos de 2 días. La magnitud del retraso observado depende en gran medida de la variedad de maíz o del genotipo de maíz, de los factores ambientales imperantes, como las condiciones del suelo, la humedad, las precipitaciones, la temperatura, etc. y/o del estrés biótico, como la infestación por patógenos distintos de *H. turcicum*. El retraso fue de al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 5 días o al menos 7 días. Esta diferencia observada en el tiempo de floración se debe al arrastre de enlace como parte de la introgresión, lo que es particularmente sorprendente ya que
- 15 tales observaciones no se conocen en el estado de la técnica. El momento de la floración es una característica agronómica importante. Puede influir directa y significativamente en el potencial de rendimiento de una planta de maíz. Un retraso en el momento de la floración conduce generalmente a una reducción del rendimiento.

- Para aclarar la causa genética de esta desventaja e identificar el arrastre de enlace, por ejemplo, se llevaron a cabo amplios programas de retrocruzamiento, acompañados de genotipado y fenotipado. El trabajo se vio respaldado por el desarrollo intensivo de marcadores moleculares específicos y selectivos en el fragmento cromosómico portador de HTN1. La tecnología para la selección asistida por marcadores (MAS) y la realización de programas de retrocruzamiento selectivo (por ejemplo, para la «clonación basada en mapas») pueden tomarse del estado de la técnica (Gupta & Varshney, 2013). El QTL con resistencia a HTN1 del donante B37HTN1 o Pepitilla se analizó utilizando los marcadores SSR bnlg1067, umc1121, MA0002, MA0003, bnlg1782, umc1287, umc1960 y bnlg240 en las generaciones filiales en el cromosoma 8 (bin 8.06) entre los marcadores MA0002 (Tabla 4) y umc1287 (Tabla 5) en un intervalo de 23,1 cM (véase la Figura 1). En las plantas de maíz con el tiempo de floración retrasado, la posición del segmento de secuencia genómica donante responsable del arrastre de enlace identificado del tiempo de floración se determinó claramente en un segundo intervalo adicional del donante en el fragmento cromosómico (ejemplo 3B; Figura 3). En una planta de maíz
- 25 según la invención, se integra un fragmento cromosómico que no contiene el segundo intervalo del donante. Aquí, el segundo intervalo se origina, por ejemplo, a partir de un progenitor recurrente que no es portador del arrastre de enlace del punto temporal de floración, o a partir de un fragmento de ADN homólogo introducido exógenamente que no es portador del arrastre de enlace, en un vector donante adecuado para recombinación homóloga dirigida. El segundo intervalo es proximal y está estrechamente acoplado al locus de resistencia HTN1 o al primer intervalo. El segundo intervalo es un intervalo entre un marcador en una primera región marcadora (M1), que está flanqueada por los marcadores SYN14136 y PZE-108076510, y un marcador en una segunda región marcadora (M2), que está flanqueada por los marcadores SYN24931 y PZE-108077560. Los marcadores flanqueadores pueden verse en la Tabla 4. Los marcadores SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 y PZE-108077560 son marcadores SNP para uso en el sistema KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/kaspgenotyping-reagents/kasp-overview/). Definen claramente las regiones marcadoras M1 y M2, a ambos lados del segmento de secuencia que lleva el arrastre de enlace del tiempo de floración en el donante B37HTN1 o Pepitilla. Como marcadores polimórficos, también son adecuados para distinguir entre el alelo donante de Pepitilla y, por ejemplo, el alelo del progenitor recurrente. Toda la información sobre el uso de estos marcadores como marcadores KASP puede encontrarse en la Tabla 4. En el Ejemplo 2 se muestran parámetros de hibridación de cebadores ejemplares adecuados para la PCR. Un experto en la materia también puede determinar otros parámetros de hibridación adecuados. Además, es práctica rutinaria para un experto con conocimiento de las regiones de marcadores descritos desarrollar otros marcadores, en particular marcadores polimórficos, en M1 y/o en M2, además de los marcadores nombrados. Utilizando los marcadores SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 y PZE-108077560 enumerados aquí o marcadores desarrollados por el propio experto en la materia en M1 y/o M2, es fácil para el experto determinar si en una planta de maíz, en cuyo genoma está integrado un fragmento cromosómico con un locus de resistencia HTN1 del donante Pepitilla, contiene o no el segundo intervalo del donante descrito anteriormente. Un experto en la materia también es consciente de que, por ejemplo, en el curso de un proceso de cultivo o de un enfoque de ingeniería genética para recombinación dirigida, un intervalo cromosómico del donante que

comprende, por ejemplo, secuencias genómicas que representan arrastre de enlace puede eliminarse del fragmento cromosómico integrado mediante recombinación genética/homóloga. El intervalo del donante Pepitilla puede sustituirse por el intervalo correspondiente del genoma parental recurrente o por un fragmento de ADN homólogo introducido exógenamente. Los marcadores en general y los aquí divulgados en particular pueden utilizarse para apoyar la selección. A continuación se describe, a modo de ejemplo, un posible uso de marcadores para la detección de un alelo: La detección de un alelo puede comprender, por ejemplo, (a) aislar al menos una molécula de ácido nucleico del genoma de una planta o célula vegetal/planta de maíz o célula vegetal de maíz y (b) analizar la molécula de ácido nucleico aislada con al menos un marcador, y opcionalmente (c) secuenciación del alelo en uno y/o más genotipos, (d) detección de uno y/o más polimorfismos y/o (e) restricción con una endonucleasa de restricción capaz de generar fragmentos de diferentes tamaños en un alelo marcador.

Una configuración preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico no contiene el segundo intervalo del donante que está flanqueado a) por los marcadores SYN14136 y PZE-108077560, b) por los marcadores PZE-108076510 y PZE-108077560, c) por los marcadores SYN14136 y SYN24931 o d) por los marcadores PZE-108076510 y SYN24931.

En una configuración preferida, la planta de maíz según la invención muestra un momento desviado de floración masculina y/o femenina en comparación con la línea Pepitilla convertida o planta convertida tal como B37HTN1, que comprende el intervalo 2 entre un marcador en una primera región marcadora (M1) flanqueada por los marcadores SYN14136 y PZE-108076510, y un marcador en una segunda región marcadora (M2) flanqueada por los marcadores SYN24931 y PZE-108077560, en donde tiempo desviado significa que la línea convertida o planta convertida tiene un retraso de al menos 2 días, de al menos 3 días, de al menos 5 días o de al menos 7 días.

Otra configuración preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico además no comprende un intervalo del donante (en lo sucesivo denominado tercer intervalo o intervalo 3) entre un marcador en la segunda región de marcadores M2 y un marcador en una tercera región de marcadores M3, que está flanqueada por los marcadores PZE-108093423 (Tabla 4) y PZE-108093748 (Tabla 4). Los marcadores PZE-108093423 y PZE-108093748 son marcadores SNP para su uso en el sistema KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/kaspgenotyping-reagents/kasp-overview/). Definen claramente la región del marcador M3. Como marcadores polimórficos, también son adecuados para distinguir entre el alelo donante y, por ejemplo, el alelo del progenitor recurrente. Toda la información sobre el uso de estos marcadores como marcadores KASP puede encontrarse en la Tabla 4. En el Ejemplo 2 se muestran parámetros ejemplares adecuados de hibridación de cebadores para PCR. Un experto en la materia también puede determinar otros parámetros de hibridación adecuados. Además, es práctica rutinaria para un experto con conocimiento de la región marcadora descrita desarrollar otros marcadores, en particular marcadores polimórficos, en M3 además de los marcadores mencionados. Utilizando los marcadores anteriormente mencionados de M2 y los marcadores PZE-108093423 y PZE-108093748 enumerados aquí o marcadores desarrollados por el experto en M3, es fácil para el experto en la materia determinar si en una planta de maíz, en cuyo genoma está integrado un fragmento cromosómico con locus de resistencia HTN1 del donante Pepitilla, está contenido o no el tercer intervalo del donante descrito anteriormente.

Otra configuración preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como se ha descrito anteriormente, en la que el fragmento cromosómico no contiene un segmento genético que comprende el segundo intervalo y el tercer intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN14136 y PZE-108093423, b) por los marcadores PZE-108076510 y PZE-108093423, c) por los marcadores SYN14136 y PZE-108093748 o d) por los marcadores PZE-108076510 y PZE-108093748.

En otro aspecto podrían determinarse segmentos genéticos adicionales en el fragmento cromosómico que, en condiciones no infestadas con *H. turcicum*, pueden causar una influencia negativa significativa en el potencial de rendimiento de una planta de maíz en cuyo genoma esté integrado un fragmento cromosómico con el locus de resistencia HTN1 del donante Pepitilla. Así, independientemente del retraso en el tiempo de floración descrito anteriormente, las líneas convertidas, así como las líneas convertidas conocidas en el estado de la técnica como B37HTN1, muestran un rendimiento significativamente reducido, en particular un rendimiento de ensilado significativamente reducido en comparación con la línea correspondiente sin introgresión (por ejemplo, línea isogénica o línea inicial), además de la resistencia a Ht proporcionada. Esto es válido incluso para líneas en cuyo genoma ya no está presente un segmento genético del donante, consistente en el intervalo 2 (entre un marcador de M1 y M2) o el intervalo 2 y 3 (entre un marcador de M1 y M3). Tales observaciones no eran de esperar por un experto en la materia, ya que la técnica anterior no proporciona ninguna indicación de tal arrastre de enlace en las líneas de introgresión HTN1. Para aclarar la causa genética de esta desventaja agronómica, por ejemplo, se llevaron a cabo amplios programas de retrocruzamiento, acompañados de genotipado y fenotipado. El trabajo se vio respaldado por el desarrollo intensivo de marcadores moleculares específicos y selectivos en el fragmento cromosómico portador de HTN1. En plantas de maíz con el rendimiento reducido

(rendimiento de ensilado), la situación de los segmentos de secuencia genómica responsables del arrastre de enlace identificado del rendimiento de ensilado se pudo determinar claramente en otros dos intervalos del donante (en lo sucesivo, cuarto intervalo o intervalo 4 y quinto intervalo o intervalo 5) en el fragmento cromosómico Pepitilla (Ejemplo 3C; Figura 3). Una planta de maíz según la invención, que en el fragmento de introgresión HTN1 de Pepitilla, en lugar del cuarto y/o quinto intervalo del donante portador de arrastre de enlace, tiene un intervalo correspondiente sin arrastre de enlace, por ejemplo del progenitor recurrente, no muestra un rendimiento de ensilado reducido y, por tanto, un rendimiento, en particular un rendimiento de ensilado, que corresponde al de una línea comparable sin introgresión (por ejemplo, línea isogénica o línea de partida). El rendimiento de ensilado de una planta de maíz según la invención sin cuarto y/o quinto intervalo del donante en comparación con una planta de maíz comparable con arrastre de enlace del rendimiento de ensilado puede ser superior en más de un 2%, que un 3%, que un 4%, que un 5%, que un 6%, que un 7%, que un 8%, que un 9%, que un 10%, que un 15% o que un 20%. El cuarto intervalo está situado proximalmente y está estrechamente acoplado al locus de resistencia HTN1 o al primer intervalo. El quinto intervalo está situado distalmente y estrechamente acoplado al locus de resistencia HTN1 o al primer intervalo.

Por lo tanto, una configuración particularmente preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como se ha descrito anteriormente, en la que el fragmento cromosómico no contiene además i) el cuarto intervalo del donante entre un marcador en la tercera región marcadora M3 y un marcador en una cuarta región marcadora M4, que está flanqueada por los marcadores MA0004 y MA0005, o ii) un segmento genético con el cuarto intervalo entre un marcador en la tercera región de marcadores M3 y un marcador en una séptima región de marcadores M7, que está flanqueada por los marcadores MA0005 y MA0021, y/o en la que el fragmento cromosómico no contiene además i) el quinto intervalo del donante entre un marcador en una quinta región marcadora M5 que está flanqueada por los marcadores MA0006 y PZE-108097482 y un marcador en una sexta región marcadora M6 que está flanqueada por los marcadores PZE-108107671 y SYN4196, o ii) un segmento genético con el quinto intervalo entre un marcador en una octava región marcadora M8 flanqueada por los marcadores MA0022 y MA0013 y un marcador en una sexta región marcadora M6 flanqueada por los marcadores PZE-108107671 y SYN4196. Los marcadores flanqueadores figuran en la Tabla 4. Los marcadores MA0004, MA0005, MA0006, MA0013, MA0021, MA0022, PZE-108097482, PZE-108107671 y SYN4196 son marcadores SNP para uso en el sistema KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/kaspgenotyping-reagents/kasp-overview/). Definen claramente las regiones marcadoras M4, M5, M6, M7 y M8, que junto con M3 establecen los segmentos de secuencia que llevan el arrastre de enlace del rendimiento del ensilado en el donante B37HTN1 o Pepitilla. Como marcadores polimórficos, también son adecuados para distinguir entre el alelo del donante y, por ejemplo, el alelo del progenitor recurrente. Toda la información sobre el uso de estos marcadores como marcadores KASP puede encontrarse en la Tabla 4. En el Ejemplo 2 se muestran parámetros ejemplares adecuados de hibridación de cebadores para PCR. Un experto en la materia también puede determinar otros parámetros de hibridación adecuados. Además, es práctica rutinaria para un experto con conocimiento de las regiones marcadoras descritas desarrollar otros marcadores, en particular marcadores polimórficos, en M4, en M5, en M6, en M7 y/o en M8, además de los marcadores descritos. Utilizando los marcadores MA0004, MA0005, MA0006, MA0013, MA0021, MA0022, PZE-108097482, PZE-108107671 y SYN4196 enumerados aquí o marcadores desarrollados internamente en M4, en M5, en M6, en M7 y/o M8 junto con los marcadores en M3 descritos anteriormente, es fácil para el experto en la materia determinar si en una planta de maíz, en cuyo genoma está integrado un fragmento cromosómico con el locus de resistencia HTN1 del donante Pepitilla está contenido o no el cuarto intervalo descrito anteriormente del donante y/o el quinto intervalo descrito anteriormente.

Otra configuración particularmente preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico no contiene (i) un segmento genético que comprende el segundo intervalo, el tercer intervalo y el cuarto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN14136 y MA0004, b) los marcadores PZE-108076510 y MA0004, c) los marcadores SYN14136 y MA0005, o d) los marcadores PZE-108076510 y MA0005, o no contiene ii) un segmento genético que comprende el segundo intervalo y el tercer intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN14136 y PZE-108093423 b) los marcadores PZE-108076510 y PZE-108093423, c) los marcadores SYN14136 y PZE-108093748, o d) los marcadores PZE-108076510 y PZE-108093748, y el quinto intervalo del donante, o no contiene iii) un segmento genético que comprende el segundo intervalo el tercer intervalo y el cuarto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN14136 y MA0004, b) por los marcadores PZE-108076510 y MA0004, c) por los marcadores SYN14136 y MA0005, o d) por los marcadores PZE-108076510 y MA0005, y el quinto intervalo del donante.

Otra configuración particularmente preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico no contiene (i) un segmento genético que comprende el segundo intervalo, el tercer intervalo y el cuarto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN14136 y MA0021 o b) por los marcadores PZE-108076510 y MA0021, o no contiene ii) un segmento genético que comprende el segundo intervalo, el tercer intervalo y el cuarto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN14136 y MA0021 o b) por los marcadores PZE-108076510 y MA0021, y el quinto intervalo del donante, o no contiene iii) un segmento genético que comprende el segundo intervalo, el tercer intervalo y el cuarto intervalo del donante y está flanqueado por a) los marcadores SYN14136

y MA0021 o b) los marcadores PZE-108076510 y MA0021, y un segundo segmento genético que comprende el quinto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores MA0022 y PZE-108107671, b) por los marcadores MA0022 y SYN4196, c) por los marcadores MA0013 y PZE-108107671 o por los marcadores MA0013 y SYN4196, o iv) un segmento genético que comprende el segundo intervalo y el tercer intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN14136 y PZE-108093423, b) por los marcadores PZE-108076510 y PZE-108093423, c) por los marcadores SYN14136 y PZE-108093748 o d) por los marcadores PZE-108076510 y PZE-108093748, y no contiene un segundo segmento genético que comprende el quinto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores MA0022 y PZE-108107671, b) por los marcadores MA0022 y SYN4196, c) por los marcadores MA0013 y PZE-108107671 o por los marcadores MA0013 y SYN4196, o no contiene v) un segmento genético que comprende el segundo intervalo, el tercer intervalo y el cuarto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN14136 y MA0021 o b) por los marcadores PZE-108076510 y MA0021, y un segundo segmento genético que comprende el quinto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores MA0022 y PZE-108107671, b) por los marcadores MA0022 y SYN4196, c) por los marcadores MA0013 y PZE-108107671 o por los marcadores MA0013 y SYN4196.

El objetivo que sirve de base para la presente invención se logra alternativamente mediante una planta de maíz en cuyo genoma se integra un fragmento cromosómico del donante Pepitilla, y el fragmento cromosómico comprende el primer intervalo del donante que muestra alelos del donante de acuerdo con el haplotipo según la Tabla 2 y tiene el polinucleótido que proporciona resistencia a *Helminthosporium turcicum* en la planta de maíz, y el fragmento cromosómico i) comprende el cuarto intervalo del donante entre un marcador de la tercera región marcadora flanqueada por los marcadores PZE-108093423 y PZE-108093748 y un marcador en la cuarta región marcadora flanqueado por los marcadores MA0004 y MA0005 o ii) no contiene un segmento genético con el cuarto intervalo entre un marcador en la tercera región de marcadores M3 y un marcador en la séptima región de marcadores M7, flanqueada por los marcadores MA0005 y MA0021. La descripción anterior con respecto, por ejemplo, a los marcadores, al polinucleótido o al fenotipado también es válido de modo correspondiente para esta y para cualquiera otra solución alternativa al problema y a las configuraciones divulgadas.

Una configuración preferida de esta planta de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico i) no contiene el cuarto intervalo del donante, que está flanqueado a) por los marcadores PZE-108093423 y MA0004, b) por los marcadores PZE-108093748 y MA0004, c) por los marcadores PZE-108093423 y MA0005, o d) por los marcadores PZE-108093748 y MA0005, o ii) no contiene un segmento genético que comprende el cuarto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores PZE-108093423 y MA0021, o b) por los marcadores PZE-108093748 y MA0021.

Otra configuración preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico no contiene además el tercer intervalo del donante entre un marcador de la segunda región de marcadores M2 y un marcador en la tercera región de marcadores M3.

Otra configuración preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico no contiene un segmento genético que comprende el tercer intervalo y el cuarto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN24931 y MA0004, b) por los marcadores PZE-108077560 y MA0004, c) por los marcadores SYN24931 y MA0005, d) por los marcadores PZE-108077560 y MA0005, e) por los marcadores SYN24931 y MA0021 o f) por los marcadores PZE-108077560 y MA0021.

Otra configuración preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico i) además no contiene el quinto intervalo del donante entre un marcador en la quinta región de marcadores M5 y un marcador en la sexta región de marcadores M6 o ii) un segmento genético con el quinto intervalo entre un marcador en la octava región de marcadores M8 y un marcador en la sexta región de marcadores M6.

Otra configuración particularmente preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico i) no contiene un segmento genético que comprende el tercer intervalo y el cuarto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN24931 y MA0004, b) por los marcadores PZE-108077560 y MA0004, c) por los marcadores SYN24931 y MA0005, o d) por los marcadores PZE-108077560 y MA0005, y el quinto intervalo, o no contiene ii) un segmento genético que comprende el tercer intervalo y el cuarto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN24931 y MA0004, b) por los marcadores PZE-108077560 y MA0004, c) por los marcadores SYN24931 y MA0005, o d) por los marcadores PZE-108077560 y MA0005, y un segundo segmento genético que comprende el quinto intervalo y está flanqueado a) por los marcadores MA0022 y SYN4196, b) por los marcadores MA0022 y PZE-108107671, c) por los marcadores MA0013 y SYN4196 o por los marcadores MA0013 y PZE-108107671.

- Otra configuración particularmente preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico no contiene i) un segmento genético que comprende el tercer intervalo y el cuarto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN24931 y MA00021 o b) por los marcadores PZE-108077560 y MA00021, y el quinto intervalo, o no contiene ii) un segmento genético que comprende el tercer intervalo y el cuarto intervalo del donante y está flanqueado a) por los marcadores SYN24931 y MA00021, o b) por los marcadores PZE-108077560 y MA00021, y un segundo segmento genético que comprende el quinto intervalo y está flanqueado a) por los marcadores MA0022 y PZE-108107671, b) por los marcadores MA0022 y SYN4196, c) por los marcadores MA0013 y PZE-108107671 o por los marcadores MA0013 y SYN4196.
- El objetivo en que se basa la presente invención se logra además alternativamente mediante una planta de maíz en cuyo genoma se integra un fragmento cromosómico del donante Pepitilla, y el fragmento cromosómico comprende el primer intervalo del donante, que muestra alelos del donante de acuerdo con el haplotipo según la Tabla 2 y tiene el polinucleótido que proporciona resistencia frente a *Helminthosporium turcicum* en la planta de maíz, y el fragmento cromosómico i) no contiene el quinto intervalo del donante entre un marcador en la quinta región de marcadores que está flanqueado por los marcadores MA0006 y PZE-108097482, y un marcador en la sexta región de marcadores que está flanqueado por los marcadores PZE-108107671 y SYN4196, o ii) un segmento genético con el quinto intervalo entre un marcador en la octava región de marcadores M8, flanqueado por los marcadores MA0022 y MA0013, y un marcador de la sexta región de marcadores M6, flanqueado por los marcadores PZE-108107671 y SYN4196.
- Otra configuración preferida de la planta de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico no contiene además el tercer intervalo del donante entre un marcador en la segunda región marcadora M2 y un marcador en la tercera región marcadora M3.
- Otra configuración particularmente preferida de las plantas de maíz según la invención es una planta de maíz como se ha descrito anteriormente, en la que el fragmento cromosómico está flanqueado a) por un marcador en la segunda región marcadora M2 y un marcador en la sexta región marcadora M6, b) por un marcador en la tercera región marcadora M3 y un marcador en la sexta región marcadora M6, c) por un marcador en la cuarta región de marcadores M4 y un marcador en la sexta región de marcadores M6, d) por un marcador en la séptima región de marcadores M7 y un marcador en la sexta región de marcadores M6, e) por un marcador en la región de marcadores M1 y un marcador en la región de marcadores M5, f) por un marcador en la segunda región de marcadores M2 y un marcador en la quinta región de marcadores M5, g) por un marcador en la tercera región de marcadores M3 y un marcador en la quinta región de marcadores M5, h) por un marcador en la cuarta región de marcadores M4 y un marcador en la quinta región de marcadores M5, i) por un marcador en la séptima región de marcadores M7 y un marcador en la quinta región de marcadores M5, j) por un marcador en la región de marcadores M1 y un marcador en la región de marcadores M8, k) por un marcador en la segunda región de marcadores M2 y un marcador en la octava región de marcadores M8, l) por un marcador en la tercera región de marcadores M3 y un marcador en la octava región de marcadores M8, m) por un marcador en la cuarta región de marcadores M4 y un marcador en la octava región de marcadores M8, o n) por un marcador en la séptima región de marcadores M7 y un marcador en la octava región de marcadores M8.
- Otra configuración particularmente preferida de las plantas de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico está flanqueado a) por los marcadores SYN24931 y SYN4196, b) por los marcadores PZE-108077560 y SYN4196, c) por los marcadores SYN24931 y PZE-108107671, d) por los marcadores PZE-108077560 y PZE-108107671, e) por los marcadores PZE-108093423 y SYN4196, f) por los marcadores PZE-108093748 y SYN4196, g) por los marcadores PZE-108093423 y PZE-108107671, h) por los marcadores PZE-108093748 y PZE-108107671, i) por los marcadores MA0004 y SYN4196, j) por los marcadores MA0005 y SYN4196, k) por los marcadores MA0004 y PZE-108107671, l) por los marcadores MA0005 y PZE-108107671, m) por los marcadores MA0021 y SYN4196, n) por los marcadores MA0021 y PZE-108107671, o) por los marcadores PZE-108076510 y MA0006, p) por los marcadores SYN14136 y MA0006, q) por los marcadores PZE-108076510 y PZE-108097482, r) por los marcadores SYN14136 y PZE-108097482, s) por los marcadores SYN24931 y PZE-108097482, t) por los marcadores PZE-108077560 y PZE-108097482, u) por los marcadores SYN24931 y MA0006, v) por los marcadores PZE-108077560 y MA0006, w) por los marcadores PZE-108093423 y PZE-108097482, x) por los marcadores PZE-108093748 y PZE-108097482, y) por los marcadores PZE-108093423 y MA0006, z) por los marcadores PZE-108093748 y MA0006, aa) por los marcadores MA0004 y PZE-108097482, ab) por los marcadores MA0005 y PZE-108097482, ac) por los marcadores MA0004 y MA0006, ad) por los marcadores MA0005 y MA0006, ae) por los marcadores MA0021 y PZE-108097482, af) por los marcadores MA0021 y MA0006, ag) por los marcadores PZE-108076510 y MA0013, ah) por los marcadores SYN14136 y MA0013, ai) por los marcadores PZE-108076510 y MA0022, aj) por los marcadores SYN14136 y MA0022, ak) por los marcadores SYN24931 y MA0013, al) por los marcadores PZE-108077560 y MA0013, am) por los marcadores SYN24931 y MA0022, an) por los marcadores PZE-108077560 y MA0022, ao) por los marcadores PZE-108093423 y MA0013, ap) por los marcadores PZE-108093748 y MA0013, aq) por los marcadores PZE-108093423 y MA0022, ar) por los marcadores PZE-108093748 y MA0022, as) por los marcadores MA0004 y MA0013, at) por los marcadores MA0005 y MA0013, au) por los marcadores MA0004 y MA0022, av) por los

marcadores MA0005 y MA0022, aw) por los marcadores MA0021 y MA0013, ax) por los marcadores MA0021 y MA0022.

Otra configuración particularmente preferida de las plantas de maíz según la invención es una planta de maíz como la descrita anteriormente, en la que el fragmento cromosómico está localizado a) entre un marcador en la segunda región de marcadores M2 y un marcador en la sexta región de marcadores M6, b) entre un marcador en la tercera región de marcadores M3 y un marcador en la sexta región de marcadores M6, c) entre un marcador en la cuarta región de marcadores M4 y un marcador en la sexta región de marcadores M6, d) entre un marcador en la séptima región de marcadores M7 y un marcador en la sexta región de marcadores M6, e) entre un marcador en la primera región de marcadores M1 y un marcador en la quinta región de marcadores M5, f) entre un marcador en la segunda región de marcadores M2 y un marcador en la quinta región de marcadores M5, g) entre un marcador en la tercera región de marcadores M3 y un marcador en la quinta región de marcadores M5, h) entre un marcador en la cuarta región de marcadores M4 y un marcador en la quinta región de marcadores M5, i) entre un marcador en la séptima región de marcadores M7 y un marcador en la quinta región de marcadores M5, j) entre un marcador en la región de marcadores M1 y un marcador en la región de marcadores M8, k) entre un marcador en la segunda región de marcadores M2 y un marcador en la octava región de marcadores M8, l) entre un marcador en la tercera región de marcadores M3 y un marcador en la octava región de marcadores M8, m) entre un marcador en la cuarta región de marcadores M4 y un marcador en la octava región de marcadores M8, o n) entre un marcador en la séptima región de marcadores M7 y un marcador en la octava región de marcadores M8.

Tabla 4: Secuencias de cebadores de marcadores KASP y asignación al alelo donante B37HTN1 procedente de la raza terrestre Pepitilla (alelo X y alelo Y: describen los valores bialélicos de los SNP)

Marcador SNP	Posición del marcador AGPv02 [bp]	Alelo X de cebador (5'-3') [SEQ ID NO]	Alelo Y de cebador Y (5'-3') [SEQ ID NO]	Cebador común (5'-3') [SEQ ID NO]	B37HTN1 Alelo donante (SNP)	Región marcadora
SYN14136	131681497	17	18	19	A	M1
PZE- 108076510	131905855	20	21	22	G	M1
SYN24931	132877982	23	24	25	A	M2
PZE- 108077560	133188880	26	27	28	A	M2
PZE- 108093423	150279048	29	30	31	A	M3
PZE- 108093740	150562764	32	33	34	G	M3
PZE- 108107571	161543406	35	36	37	C	M6
SYN4196	161766769	38	39	40	C	M6
MA0004	151688652	41	42	43	A	M4
MA0005	151831049	44	45	46	C	M4/M7
MA0021	151907173	241	242	243	G	M7
MA0006	152688310	47	48	49	A	M5
PZE- 108097482	153139646	50	51	52	A	M5
MA0002	147729853	53	54	55	A	
MA0003	151346164	56	57	58	C	
MA0007	152045106	59	60	61	T	
MA0008	152045141	62	63	64	T	
MA0009	152045402	65	66	67	T	
MA0010	152045516	68	69	70	C	
MA0011	152045812	71	72	73	T	
MA0012	152048502	74	75	76	A	

MA0022	152046529	244	245	246	A	M8
MA0013	152123057	77	78	79	G	M8
MA0014	152133380	80	81	82	T	
MA0015	152144310	83	84	85	A	
MA0016	152250992	86	87	88	A	
MA0017	152301656	89	90	91	A	
MA0018	152304127	92	93	94	A	
MA0019	152630794	95	96	97	C	
MA0020	152753635	98	99	100	A	
PZE- 100095008	152433358	101	102	103	T	
PZE- 100095011	152435855	104	105	106	A	
PZE- 100095010	152703573	107	108	109	C	
PZE- 100095791	152667338	110	111	112	G	

La presente invención también se refiere a una semilla o grano, un tejido, un órgano, una parte y una célula de las plantas de maíz descritas anteriormente según la invención. En el presente documento, la semilla o grano es una semilla o grano en cuyo genoma está integrado el fragmento cromosómico de las configuraciones de la invención descritas anteriormente.

- 5 En el presente documento se describe además un procedimiento para identificar una planta de maíz resistente a *H. turcicum* en cuyo genoma está integrado un fragmento cromosómico de la Pepitilla donante, que comprende la detección de al menos dos alelos en el genoma de la planta, en cuyo caso al menos un alelo está localizado en un segmento genómico que está flanqueado por un marcador en la primera región marcadora M1, la segunda región marcadora M2, la tercera región marcadora M3, la cuarta región marcadora M4 o la séptima región marcadora M7 y por el polinucleótido descrito anteriormente que proporciona resistencia a *H.*
- 10 *turcicum* en la planta de maíz, y al menos un alelo está localizado en un segmento genómico flanqueado por el polinucleótido y por un marcador en la sexta región marcadora M6, la quinta región marcadora M5 o la octava región marcadora M8. Las regiones marcadoras y los marcadores ejemplares en estas regiones marcadoras se han descrito antes en el presente documento. Preferentemente, la planta de maíz identificada es una planta de maíz según la invención. La invención también se refiere a una planta de maíz que ha sido identificada utilizando dicho procedimiento para la identificación.

- Se describe además en el presente documento un procedimiento para aumentar el rendimiento de una planta de maíz resistente a *H. turcicum* en cuyo genoma está integrado un fragmento cromosómico del donante Pepitilla, y el procedimiento comprende un paso que comprende eliminar el segundo intervalo del donante, el
- 20 cuarto intervalo del donante o el quinto intervalo del donante, y el fragmento cromosómico comprende el primer intervalo del donante descrito anteriormente que muestra alelos del donante de acuerdo con el haplotipo según la Tabla 2 y tiene un polinucleótido que proporciona resistencia a *Helminthosporium turcicum* en la planta de maíz. Por ejemplo, la eliminación puede lograrse mediante recombinación genética durante un proceso de cruce entre dos plantas de maíz, en cuyo caso una planta de maíz parental es portadora del locus de resistencia HTN1 de Pepitilla. Además del uso de técnicas de cultivo convencionales para generar la recombinación genética, que da lugar a la sustitución de al menos uno de los intervalos donantes identificados anteriormente con arrastre de enlace por secuencias genómicas del progenitor recurrente, que preferiblemente están libres de genes no deseados, la biotecnología moderna proporciona al experto más herramientas diversas que permiten una ingeniería precisa del genoma. Las herramientas conocidas incluyen, por ejemplo,
- 30 meganucleasas (Silva *et al.*, 2011), endonucleasas homing (Chevalier 2002), nucleasas zinc finger, nucleasas TALE (WO 2010/079430; WO 2011/072246) o CRISPR (Gaj *et al.*, 2013). Se trata de proteínas artificiales de fusión de nucleasas capaces de cortar específicamente moléculas de ácido nucleico bicatenarias, como el ADN vegetal, y generar así roturas bicatenarias en las posiciones deseadas del genoma. Aprovechando los mecanismos propios de la célula para reparar las roturas bicatenarias inducidas se puede lograr entonces la recombinación homóloga o «unión de extremos no homólogos» (nonhomologous end-joining), que puede conducir a la eliminación de los intervalos del donante que portan el arrastre de enlace. Las secuencias diana adecuadas en el genoma para los dominios de reconocimiento de las nucleasas anteriores pueden tomarse, por ejemplo, de la información de secuencia de los marcadores SNP (Tabla 4) o en sus intervalos. Sin embargo, un experto en la materia también es capaz de identificar otras secuencias, preferiblemente dentro o entre las
- 40 seis regiones marcadoras descritas anteriormente, que son adecuadas como secuencias diana para el dominio de reconocimiento de las nucleasas.

A continuación, se explicarán con más detalle dos enfoques de ingeniería genética, con ayuda de los cuales se apoya o se consigue directamente la eliminación de secuencias de nucleótidos portadoras de arrastre de enlace de un genoma vegetal. Los siguientes procedimientos, así como los procedimientos de cultivo convencionales, pueden utilizarse para producir las plantas de maíz según la invención.

- 5 Como ya se ha explicado, las herramientas moleculares anteriores son capaces de inducir roturas bicatenarias de ADN en lugares definidos del genoma de una planta. El uso de nucleasas TALE (TALENs) o nucleasas de
 10 dedos de zinc (ZFNs) es particularmente ventajoso en este caso. El dominio de reconocimiento TALE o ZF permite la unión específica en cualquier lugar del genoma. Conociendo la secuencia en la región diana, el dominio de reconocimiento TALE o ZF puede diseñarse cortado a la medida para que solo se una en el sitio
 deseado del genoma. Por ejemplo, si la secuencia de reconocimiento se fusiona con una endonucleasa no
 específica como FokI, se puede inducir una rotura bicatenaria (DSB) en un sitio definido del genoma, lo que
 permite la ingeniería genómica dirigida (Tzfira *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011; Puchta y Hohn 2010). El experto está
 familiarizado con el manejo de las endonucleasas FokI y la creación de TALENs y ZFNs adecuadas a partir del
 estado de la técnica.
- 15 Una rotura bicatenaria inducida puede, por ejemplo, estimular la recombinación homóloga entre un locus génico
 diana endógeno (por ejemplo, una de las regiones marcadoras anteriores) y un fragmento de ADN homólogo
 introducido exógenamente que, por ejemplo, no sea portador de arrastre de enlace (por ejemplo, en un vector
 donante adecuado). Esta denominada «sustitución de genes» o «edición del genoma» puede llevarse a cabo
 20 in vitro y no requiere un paso de cruce entre dos plantas. Para ello, las plantas a modificar deben transformarse
 transitoriamente con ácidos nucleicos que codifiquen las TALEN o ZFN diseñadas, por un lado, y con el
 fragmento de ADN exógeno, por otro. El fragmento de ADN puede provenir de una planta de la misma especie
 y corresponde, por ejemplo, al segmento cromosómico que se desea sustituir, solo que sin arrastre de enlace.
 Una vez completada la recombinación homóloga inducida, las células con genoma modificado pueden
 regenerarse en plantas y seleccionarse para determinar si el arrastre de enlace se ha eliminado con éxito y si
 25 los elementos de ADN transformados previamente de forma transitoria se han vuelto a perder en el curso de la
 división celular regenerativa. Los marcadores descritos anteriormente también pueden utilizarse para este fin.
 Los procedimientos de transformación y regeneración son conocidos en el estado de la técnica y se explican
 de nuevo a continuación.
- Además, las TALENs y ZFNs anteriores también pueden utilizarse transgénicamente en el proceso de meiosis,
 30 donde inducen roturas bicatenarias en sitios predeterminados en el genoma y así aumentan la probabilidad de
 recombinación en estos sitios en el paso de «crossing over» (cruzado). Esto puede favorecer significativamente
 la eliminación del arrastre de enlace. Un experto en la materia sabe cómo producir plantas libres de arrastre de
 enlace y de TALENs o ZFNs a partir de las células haploides una vez completada la meiosis. En otro aspecto,
 35 la presente invención se refiere a un procedimiento para producir una planta de maíz según la invención, que
 comprende los siguientes pasos: (A) proporcionar una primera planta de maíz en cuyo genoma está integrado
 un fragmento cromosómico del donante Pepitilla, y el fragmento cromosómico comprende un primer intervalo
 del donante que muestra alelos del donante de acuerdo con el haplotipo según la Tabla 2 y tiene un
 polinucleótido que proporciona resistencia a *Helminthosporium turcicum* en la planta de maíz, y el fragmento
 cromosómico comprende un segundo intervalo del donante y/o el cuarto intervalo del donante y/o el quinto
 40 intervalo del donante, (B) proporcionar una segunda planta de maíz, (C) cruzar la planta de maíz de (A) con la
 planta de maíz de (B) y (D) seleccionar una planta de maíz según la invención, preferentemente utilizando al
 menos un marcador descrito anteriormente. Alternativamente, la presente invención se refiere a un
 procedimiento para producir una planta de maíz según la invención, que comprende los siguientes pasos: (A)
 45 transformar transitoriamente una célula de planta de maíz con una primera secuencia de nucleótidos que
 codifica una primera proteína con actividad endonucleasa (por ejemplo, una proteína de fusión de
 endonucleasa TALE o ZF) capaz de inducir una rotura bicatenaria de ADN en el genoma de la célula de planta
 de maíz entre la región marcadora M2 y M4, y con una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una
 segunda proteína con actividad endonucleasa (por ejemplo, una proteína de fusión de endonucleasa TALE o
 ZF) capaz de inducir una rotura bicatenaria de ADN en el genoma de la célula de planta de maíz entre la región
 50 marcadora M5 y M6, (B) introducir transitoriamente un vector donante en la primera célula vegetal de maíz que
 porta un fragmento cromosómico de la Pepitilla donante, y el fragmento cromosómico comprende un primer
 intervalo del donante que muestra alelos del donante de acuerdo con el haplotipo conforme a la Tabla 2 y tiene
 un polinucleótido que proporciona resistencia frente a *Helminthosporium turcicum* en la planta de maíz, y el
 fragmento cromosómico comprende además los segmentos cromosómicos de la Pepitilla donante entre los
 55 sitios de las roturas bicatenarias de (A), de modo que se produzca recombinación homóloga entre el genoma
 de la primera célula de planta de maíz y el fragmento cromosómico del vector donante, (C) regenerar una planta
 de maíz a partir de la célula de planta de maíz, (D) identificar una planta de maíz según la invención,
 preferentemente utilizando al menos un marcador descrito anteriormente. De modo particularmente preferible,
 las secuencias de ácido nucleico primera y segunda, introducidas transitoriamente, y el vector de giro se han
 60 perdido de nuevo. El experto sabe cómo esto puede lograrse y detectarse.

También se describen en el presente documento los marcadores descritos anteriormente como oligonucleótidos, en particular oligonucleótidos cebadores. Preferiblemente, los oligonucleótidos son

oligonucleótidos aislados. Un oligonucleótido comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de una de las SEQ ID NOs: 41-49, 53-100 y 229-250. Además, la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de una de las SEQ ID NOs: 17-250 para identificar una planta de maíz resistente a *H. turcicum*. Preferiblemente, la resistencia se origina a partir del donante Pepitilla y es HTN1.

El objetivo en que se basa la presente invención se logra además alternativamente mediante una planta transgénica, en particular una planta de maíz transgénica, que comprende una célula vegetal transgénica como se describe más adelante. Además, la invención también se refiere a una parte de esta planta según la invención, en cuyo caso una parte puede ser una célula, un tejido, un órgano o una asociación de varias células, tejidos u órganos. Una asociación de varios órganos es, por ejemplo, una flor o una semilla. En una configuración particular, la invención se refiere a una semilla de la planta transgénica, y la semilla comprende el polinucleótido descrito más adelante como un transgén. Preferentemente, una planta transgénica de la presente invención, en particular una planta de la especie *Zea mays*, muestra una mayor resistencia a *H. turcicum* que una planta correspondiente no transformada (planta isogénica sin el transgén). Una planta transgénica resistente a Ht según la invención muestra una mayor resistencia a *H. turcicum* de al menos 1 nota de evaluación, preferiblemente de al menos 2 notas de evaluación o al menos 3 notas de evaluación y particularmente preferiblemente de al menos 4 notas de evaluación (véase el esquema de notas de evaluación en la Tabla 3).

Además, la invención proporciona un procedimiento para producir una planta transgénica que comprende un paso de introducir el polinucleótido descrito en el presente documento o el vector de la presente invención descrito más adelante en una célula vegetal y opcionalmente un paso de seleccionar una célula vegetal transgénica. Además, dicho procedimiento para producir una planta transgénica se caracteriza por un paso posterior que incluye la regeneración de la planta transgénica a partir de la célula vegetal transgénica producida en el primer paso. Los procedimientos de regeneración son conocidos por el experto en la materia.

En el presente documento se describe además el polinucleótido que comprende uno o más genes que proporcionan resistencia del locus HTN1 de Pepitilla (Tabla 1) o seleccionados de RLK1 y EXT1 (véase la Tabla 1) o alelos de genes de los mismos. El gen o alelo del gen puede causar un fenotipo de resistencia con las características típicas de HTN1 en condiciones de infestación por *H. turcicum*. Estructuralmente, el polinucleótido se caracteriza porque comprende una molécula de ácido nucleico (a) que tiene una secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, (b) que tiene una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una de las secuencias de nucleótidos según SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 preferentemente en toda la longitud de la secuencia, (c) que se hibrida con la cadena complementaria de una molécula de ácido nucleico según (a) o (b) en condiciones estrictas, (d) que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16, o (e) que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a una de las secuencias de aminoácidos según (d). En una configuración preferida, el polinucleótido se caracteriza porque comprende una molécula de ácido nucleico (aa) que tiene una secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1 o 5, (bb) que tiene una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una de las secuencias de nucleótidos según SEQ ID NO: 1 o 5, preferentemente en toda la longitud de la secuencia, (cc) que se hibrida con la cadena complementaria de una molécula de ácido nucleico según (aa) o (bb) en condiciones estrictas, (dd) que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 o 6, o (ee) que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a una de las secuencias de aminoácidos según (dd). Preferiblemente, el polinucleótido puede estar aislado y/o purificado de su entorno genético natural o está presente en forma sustancialmente pura u homogénea. Preferiblemente, el polinucleótido es ADN, y particularmente preferible ADNc, es decir, el polinucleótido comprende el ADNc de uno o más genes que proporcionan resistencia (Tabla 1). Sin embargo, también puede estar presente como ARN. El experto sabe cómo derivar la secuencia de ADN genómico a partir de la información de la secuencia descrita en el presente documento. Un polinucleótido descrito en el presente documento codifica al menos un polipéptido capaz de conferir resistencia frente al patógeno *Helminthosporium turcicum* en una planta en la que se expresa el polipéptido. Preferentemente, el polipéptido codificado por el polinucleótido, o partes del mismo, descrito en el presente documento proporciona resistencia al patógeno *Helminthosporium turcicum*, en particular en una planta del género *Zea* o en una planta de la especie *Zea mays*.

Además, también se describe en el presente documento un polipéptido que es capaz de conferir resistencia a *H. turcicum* en una planta en la que se expresa el polipéptido y que está codificado por el polinucleótido descrito en el presente documento o una parte del mismo. El polipéptido tiene preferentemente una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16 o de modo particularmente preferible una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 o 6. El polipéptido puede ser un polipéptido aislado.

También se describe en el presente documento un vector que comprende el polinucleótido descrito en el presente documento. El vector puede ser un plásmido, cósmido, fago o vector de expresión, vector de transformación, vector lanzadera o vector de clonación, puede ser de cadena doble o simple, lineal o circular, o puede transformar un hospedador procariota o eucariota ya sea por integración en su genoma o de modo extracromosómico. Preferiblemente, el polinucleótido descrito en el presente documento está unido de forma operativa en un vector de expresión a una o más secuencias reguladoras que permiten la transcripción y, opcionalmente, la expresión en una célula hospedadora procariota o eucariota. Por ejemplo, el polinucleótido está bajo el control de un promotor o terminador adecuado. Los promotores adecuados pueden ser promotores inducidos constitutivamente (por ejemplo, el promotor 35S del «virus del mosaico de la coliflor» (Odell *et al.*, 1985), y los promotores especialmente adecuados son los inducibles por patógenos (por ejemplo, el promotor PR1 del perejil (Rushton *et al.*, 1996). Los promotores inducibles por patógenos especialmente adecuados son los sintéticos o quiméricos que no se dan en la naturaleza, están compuestos por varios elementos y contienen un promotor mínimo, así como al menos un elemento regulador cis, en dirección ascendente del promotor mínimo, que sirve como sitio de unión para factores de transcripción específicos. Los promotores quiméricos se diseñan en función de los requisitos deseados y son inducidos o reprimidos por diferentes factores. Pueden encontrarse ejemplos de tales promotores en los documentos WO 2000/29592 y WO 2007/147395. Un terminador adecuado es, por ejemplo, el terminador nos (Depicker *et al.*, 1982).

Además de los vectores descritos anteriormente, también se describe en el presente documento un procedimiento que comprende la introducción de un vector descrito en una célula hospedera. El vector puede introducirse, por ejemplo, por conjugación, movilización, transformación biolística, transformación proporcionada por *Agrobacterium*, transfección, transducción, infiltración al vacío o electroporación. Tales procedimientos, así como los procedimientos para la preparación de los vectores descritos, son familiares para el experto (Sambrook *et al.* 2001).

Se describe además en el presente documento una célula hospedera que comprende el polinucleótido o vector de la presente invención como se describe en el presente documento. Una célula hospedera en el sentido de la invención puede ser una célula procariota (por ejemplo, bacteriana) o eucariota (por ejemplo, una célula vegetal o una célula de levadura). Preferentemente, la célula hospedera es una agrobacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* o una célula vegetal que comprende el polinucleótido o el vector de la presente invención tal como se describe en el presente documento. El experto conoce numerosos procedimientos, tales como conjugación o electroporación, mediante los cuales puede introducir el polinucleótido o el vector de la presente invención, descritos en el presente documento, en una *Agrobacterium*, así como también procedimientos tales como diversos procedimientos de transformación (transformación biolística, transformación proporcionada por *Agrobacterium*) mediante los cuales puede introducir el polinucleótido o el vector de la presente invención, descritos en el presente documento, en una célula vegetal (Sambrook *et al.* 2001).

También se describe en el presente documento una célula vegetal transgénica que comprende el polinucleótido descrito anteriormente como transgén o el vector de la presente invención. Dicha célula vegetal transgénica es, por ejemplo, una célula vegetal que se transforma, preferiblemente de forma estable, con el polinucleótido descrito en el presente documento o con el vector de la presente invención. En una configuración preferida de la célula vegetal transgénica, el polinucleótido está unido operativamente a una o más secuencias reguladoras que permiten la transcripción y opcionalmente la expresión en la célula vegetal. La construcción global, consistente en el polinucleótido descrito y la(s) secuencia(s) reguladora(s), puede entonces representar el transgén. Dichas secuencias reguladoras son, por ejemplo, un promotor o un terminador. El experto conoce numerosos promotores y terminadores funcionales aplicables en plantas. Preferentemente, una célula vegetal transgénica de la presente invención, en particular una célula de una planta de la especie *Zea mays*, muestra una mayor resistencia a *H. turcicum* que una célula vegetal no transformada correspondiente (la célula vegetal (isogénica) sin el transgén). Las células vegetales transgénicas resistentes a Ht según la invención muestran un aumento de la resistencia frente a *H. turcicum* de al menos 1 nota de evaluación, preferiblemente de al menos 2 notas de evaluación o al menos 3 notas de evaluación y de modo particularmente preferible de al menos 4 notas de evaluación (véase el esquema de evaluación en la Tabla 3). También se describe en el presente documento un procedimiento para producir una célula vegetal transgénica como se ha descrito anteriormente, que comprende un paso de introducción del polinucleótido o del vector de la presente invención, descritos en el presente documento, en una célula vegetal. Por ejemplo, la introducción puede tener lugar por transformación, preferentemente por transformación estable. Las técnicas adecuadas para la introducción, como la transformación biolística, la transformación proporcionada por *Agrobacterium* o la electroporación, son conocidas por los expertos en la materia (Sambrook *et al.* 2001).

También se describe en el presente documento un procedimiento para impartir o aumentar la resistencia a *H. turcicum* en una planta, preferentemente una planta de la especie *Zea mays*, que comprende un paso de transformación de una célula vegetal con el polinucleótido descrito anteriormente o el vector de la presente invención. Preferiblemente, este procedimiento conduce a un aumento de la resistencia a *H. turcicum* de al menos 1 nota de evaluación, preferiblemente de al menos 2 notas de evaluación o al menos 3 notas de

evaluación y de modo particularmente preferible de al menos 4 notas de evaluación (véase el esquema de evaluación en la Tabla 3).

También se describe en el presente documento un procedimiento para modificar el fenotipo de resistencia de una planta, en particular una planta de maíz, frente al patógeno *Helminthosporium turcicum*, que comprende un paso de mutar el gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla o un alelo génico del mismo. Preferentemente, el gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla codifica un polipéptido según SEQ ID NO: 2 o un homólogo de un polipéptido según SEQ ID NO: 2 que, en condiciones de infestación con *H. turcicum*, provoca un fenotipo de resistencia con las características típicas de HTN1. El gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla o un alelo génico del mismo puede ser transgénico o endógeno en el genoma de la planta. La modificación del fenotipo de resistencia puede significar un cambio en la especificidad de la raza del patógeno y/o un cambio en el nivel de resistencia medido como una nota de evaluación basada en características fenotípicas como, por ejemplo, el área foliar afectada (véase la Tabla 3) o medido como valor AUDPC (véase el Ejemplo 1 C). Preferentemente, el nivel de resistencia tras la modificación del fenotipo de resistencia se sitúa entre el nivel de resistencia de una planta que expresa el gen que proporciona resistencia no mutado del locus HTN1 de Pepitilla y el nivel de resistencia de una planta isogénica que no expresa el gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla; pero también puede estar por encima del nivel de resistencia de una planta que exprese el gen que proporciona resistencia no mutado del locus HTN1 de Pepitilla. De manera particularmente preferente, el nivel de resistencia se encuentra entre el nivel de resistencia de una planta que expresa el polipéptido según SEQ ID NO: 2 y el nivel de resistencia de una planta isogénica que no expresa el polipéptido según SEQ ID NO: 2; sin embargo, también puede estar por encima del nivel de resistencia de una planta que expresa el polipéptido según SEQ ID NO: 2. El término mutación puede entenderse aquí como un cambio realizado por el ser humano en la secuencia genética (mutación). Ejemplos de ello son la exposición de plantas, células vegetales o partes de plantas a una dosis elevada de mutágenos químicos, radiológicos o de otro tipo y la posterior selección de mutantes. Alternativamente, la mutación también puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, tiling (laboreo), nucleasas TALE, nucleasas de dedos de zinc o un sistema CRISPR/Cas o mediante fusión, inserción, delección o sustitución en la secuencia de ADN o la secuencia de aminoácidos. Para llevar a cabo el paso de mutación, el experto dispone de suficientes instrucciones técnicas de actuación del estado de la técnica conocido. Preferentemente, la mutación del gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla conduce a al menos un intercambio de aminoácidos, al menos dos intercambios de aminoácidos, al menos tres intercambios de aminoácidos, al menos cinco o más intercambios de aminoácidos. En el caso de varios intercambios de aminoácidos, éstos también pueden estar presentes en diferentes alelos del gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla, es decir, la mutación puede estar presente de forma heterocigota pero también homocigota.

En una configuración preferida del procedimiento para modificar el fenotipo de resistencia de una planta, la mutación del gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla conduce a una mutación puntual en la secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1 en la posición 1365 con el intercambio de bases de una G por una A o en la posición 1490 con el intercambio de bases de una G por una A. Además, esta configuración también se refiere a la mutación que conduce a un intercambio de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 en la posición 455 de M (metionina) a I (isoleucina) o en la posición 497 de G (glicina) a E (ácido glutámico). En otra configuración preferida del procedimiento, la mutación del gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla conduce a una mutación puntual, que da lugar a un intercambio de aminoácidos, en la secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1 entre la posición 1365 y la posición 1490 o la configuración se refiere a la mutación que conduce a un intercambio de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 entre la posición 455 y la posición 497.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para producir una planta, en particular una planta de maíz, que tiene un fenotipo de resistencia modificado frente al patógeno *Helminthosporium turcicum*, que comprende un paso de mutación del gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla o un alelo génico del mismo en al menos una célula de la planta o en al menos una célula a partir de la cual se regenera la planta. Además, el procedimiento puede comprender un paso de regeneración de al menos una planta a partir de al menos una célula mutante y de selección de la planta regenerada basándose en el fenotipo modificado de resistencia frente al patógeno *Helminthosporium turcicum*. Preferentemente, el gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla codifica un polipéptido según SEQ ID NO: 2 o un homólogo de un polipéptido según SEQ ID NO: 2, que en condiciones de infestación con *H. turcicum* provoca un fenotipo de resistencia con las características típicas de HTN1. El gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla o un alelo génico del mismo puede ser transgénico o endógeno en el genoma de la planta. Un fenotipo de resistencia modificado puede significar un cambio en la especificidad de la raza del patógeno y/o un cambio en el nivel de resistencia medido como una nota de evaluación basada en rasgos fenotípicos como, por ejemplo, el área foliar afectada (véase la Tabla 3) o medido como valor AUDPC (véase el Ejemplo 1 C). Preferentemente, el nivel de resistencia del fenotipo de resistencia modificado está entre el nivel de resistencia de una planta que expresa el gen que proporciona resistencia no mutado del locus HTN1 de Pepitilla y el nivel de resistencia de una planta isogénica que no expresa el gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla; pero también puede estar por encima del nivel de resistencia de una planta que exprese el gen que proporciona resistencia no mutado del locus HTN1 de Pepitilla. De manera particularmente preferente, el nivel de resistencia

se encuentra entre el nivel de resistencia de una planta que expresa el polipéptido según SEQ ID NO: 2 y el nivel de resistencia de una planta isogénica que no expresa el polipéptido según SEQ ID NO: 2; sin embargo, también puede estar por encima del nivel de resistencia de una planta que expresa el polipéptido según SEQ ID NO: 2. El término mutación puede entenderse aquí como un cambio realizado por el ser humano en la secuencia genética (mutación). Ejemplos de ello son la exposición de plantas, células vegetales o partes de plantas a una dosis elevada de mutágenos químicos, radiológicos o de otro tipo y la posterior selección de mutantes. Alternativamente, la mutación también puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, laboreo, nucleasas TALE, nucleasas de dedos de zinc o un sistema CRISPR/Cas o mediante fusión, inserción, delección o sustitución en la secuencia de ADN o la secuencia de aminoácidos. Para llevar a cabo el paso de mutación, el experto dispone de suficientes instrucciones técnicas de actuación del estado de la técnica conocido. Preferentemente, la mutación del gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla conduce a al menos un intercambio de aminoácidos, al menos dos intercambios de aminoácidos, al menos tres intercambios de aminoácidos, al menos cinco o más intercambios de aminoácidos. En el caso de varios intercambios de aminoácidos, éstos también pueden estar presentes en diferentes alelos génicos del gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla, es decir, la mutación puede ser heterocigota, pero también homocigota.

En una configuración preferida del procedimiento para producir una planta con un fenotipo de resistencia modificado frente al patógeno *Helminthosporium turcicum*, la mutación del gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla conduce a una mutación puntual en la secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1 en la posición 1365 con el intercambio de bases de una G por una A o en la posición 1490 con el intercambio de bases de una G por una A. Además, esta configuración también se refiere a la mutación que conduce a un intercambio de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 en la posición 455 de M (metionina) a I (isoleucina) o en la posición 497 de G (glicina) a E (ácido glutámico). En otra configuración preferida del procedimiento, la mutación del gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla conduce a una mutación puntual, que da como resultado un intercambio de aminoácidos, en la secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1 entre la posición 1365 y la posición 1490 o la configuración se refiere a la mutación que conduce a un intercambio de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 entre la posición 455 y la posición 497.

También se describen en el presente documento plantas o una parte de las mismas que pueden producirse mediante un procedimiento para producir una planta con un fenotipo de resistencia modificado frente al patógeno *Helminthosporium turcicum*.

También se describe en el presente documento una planta o parte de la misma que tiene una mutación en el gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla o un alelo génico del mismo. Preferiblemente, la mutación conduce a un fenotipo de resistencia modificado como el descrito anteriormente. Preferentemente, el gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla codifica un polipéptido según SEQ ID NO: 2 o un homólogo de un polipéptido según SEQ ID NO: 2, que causa un fenotipo de resistencia con las características típicas de HTN1 en condiciones de infestación con *H. turcicum*. El gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla o un alelo génico del mismo puede estar presente transgénica o endógenamente en el genoma de la planta. En una configuración preferida de la planta o parte de la misma, la mutación es una mutación puntual en la secuencia nucleotídica según SEQ ID NO: 1 en la posición 1365 con el intercambio de bases de una G por una A o en la posición 1490 con el intercambio de bases de una G por una A. Además, esta configuración también se refiere a una mutación que conduce a un intercambio de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 en la posición 455 de M (metionina) a I (isoleucina) o en la posición 497 de G (glicina) a E (ácido glutámico). En otra configuración preferida de la planta o parte de la misma, la mutación del gen que proporciona resistencia del locus HTN1 de Pepitilla es una mutación puntual que da lugar a un intercambio de aminoácidos, en la secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1 entre la posición 1365 y la posición 1490 o la configuración se refiere a una mutación que da lugar a un intercambio de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 entre la posición 455 y la posición 497.

Algunos de los términos utilizados en la presente solicitud se explican con más detalle a continuación:

El término «alelo» se refiere a una de dos o más secuencias de nucleótidos en un locus particular del genoma. Un primer alelo se encuentra en un cromosoma, un segundo alelo en un segundo cromosoma en la misma posición. Si los dos alelos difieren, son heterocigotos; si son el mismo alelo, son homocigotos. Los diferentes alelos de un gen (alelos génicos) difieren al menos en un SNP. Dependiendo del contexto de la descripción, un alelo también significa un único SNP, lo que, por ejemplo, permite distinguir entre el donante de HTN1 (Pepitilla) y el progenitor recurrente.

El término «fragmento cromosómico» es un segmento de ADN cromosómico específico de un cromosoma determinado que comprende al menos un gen. Un fragmento cromosómico integrado proviene de una fuente donante. En el sentido de la invención, el orden secuencial de los genes dentro de un fragmento cromosómico integrado puede corresponder al orden presente en el fragmento cromosómico original de la fuente donante. Así, el fragmento cromosómico integrado puede estar presente sin cambios en toda su longitud en relación con el fragmento cromosómico correspondiente en la fuente donante. Un fragmento cromosómico o una parte del

mismo puede representar un «haplotipo» específico, en cuyo caso el fragmento cromosómico tiene entonces determinados SNP por los que el haplotipo también está claramente especificado y puede identificarse.

Los términos «distal» y «proximal» denotan la posición de un intervalo cromosómico o de un segmento genético en relación con un sitio de referencia particular (por ejemplo, un polinucleótido particular, otro intervalo cromosómico o un gen) en un cromosoma entero, donde distal significa que el intervalo o segmento se localiza en el lado del sitio de referencia no enfrentado al centrómero del cromosoma, y proximal significa que el intervalo o segmento se localiza en el lado del sitio de referencia enfrentado al centrómero del cromosoma.

«Estrechamente acoplados» o «estrechamente vinculados» significa dos loci, dos intervalos, dos segmentos genéticos o dos marcadores (loci marcadores) que están alejados entre sí en menos de 15 cM, que están alejados entre sí en menos de 12 cM, que están alejados entre sí en menos de 10 cM, que están alejados entre sí en menos de 8 cM, que están alejados entre sí en menos de 7 cM, que están alejados entre sí en menos de 6 cM, que están alejados entre sí en menos de 5 cM, que están alejados entre sí en menos de 4 cM, que están alejados entre sí en menos de 3 cM, que están alejados entre sí en menos de 2 cM, que están alejados entre sí en menos de 1 cM, que están alejados entre sí en menos de 0,5 cM, que están alejados entre sí en menos de 0,2 cM, que están alejados entre sí en menos de 0,1 cM, según lo determinado por el mapa genético de IBM2 vecinos 4 disponible públicamente en el sitio web de Maize GDB.

El término «rendimiento», tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a la productividad por unidad de superficie de un producto de cultivo determinado que tiene valor comercial. Por ejemplo, el rendimiento del maíz suele medirse en toneladas métricas de semilla o grano por hectárea (ha) y temporada o en toneladas métricas de biomasa seca por hectárea (ha) y temporada. A menos que se indique explícitamente o se especifique lo contrario, el rendimiento puede referirse a masa fresca o seca absoluta, masa fresca o seca relativa, rendimiento de ensilado (también llamado rendimiento de ensilado de maíz o rendimiento total de materia seca (Total Dry Matter Yield) o rendimiento de grano. El rendimiento está influido por factores genéticos y ambientales y se compone básicamente de numerosas propiedades agronómicas que representan características de una planta basadas en elementos genéticos y contribuyen al rendimiento final a lo largo de la temporada. Estas propiedades agronómicas individuales incluyen, por ejemplo, la emergencia de la semilla, la vitalidad vegetativa, la tolerancia al estrés, la resistencia o tolerancia a las enfermedades, la resistencia a los herbicidas, la tendencia a la ramificación, la época de floración, la formación de la semilla, la densidad de la semilla, la estabilidad y la tendencia al encamado, la capacidad de trilla (maduración uniforme), etc.

El término «segmento genético con» un intervalo especificado más detalladamente debe entenderse como un segmento genético que incluye o comprende el intervalo especificado más detalladamente, es decir, no se limita al intervalo especificado más detalladamente. Por ejemplo, un segmento genético con el quinto intervalo entre un marcador en la octava región de marcadores M8 flanqueado por los marcadores MA0022 y MA0013 y un marcador en la sexta región de marcadores M6 flanqueado por los marcadores PZE-108107671 y SYN4196, significa que el segmento genético comprende el quinto intervalo y el segmento genético está localizado entre un marcador en la octava región de marcadores M8 flanqueada por los marcadores MA0022 y MA0013, y un marcador de la sexta región de marcadores M6 flanqueada por los marcadores PZE-108107671 y SYN4196.

Por «hibridación» se entiende un procedimiento en el que una molécula de ácido nucleico monocatenaria se une a una cadena de ácido nucleico en gran medida complementaria, es decir, forma parejas de bases con la misma. Los procedimientos estándar para la hibridación se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* 2001. Preferentemente, esto se entiende como que al menos el 60%, más preferentemente al menos el 65%, 70%, 75%, 80% u 85%, de modo particularmente preferible el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las bases de la molécula de ácido nucleico forman un par de bases con la cadena de ácido nucleico en gran medida complementaria. La posibilidad de tal combinación depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. El término «rigurosidad» se refiere a las condiciones de hibridación. Se habla de alta rigurosidad cuando el emparejamiento de bases es más difícil, y de baja rigurosidad cuando el emparejamiento de bases es más fácil. La rigurosidad de las condiciones de hibridación depende, por ejemplo, de la concentración de sal o de la fuerza iónica y de la temperatura. En general, la rigurosidad puede incrementarse aumentando la temperatura y/o disminuyendo el contenido de sal. El término «condiciones de hibridación estrictas» se refiere a condiciones en las que la hibridación tiene lugar predominantemente solo entre moléculas de ácido nucleico homólogas. El término «condiciones de hibridación» se refiere no solo a las condiciones que prevalecen durante la propia combinación de los ácidos nucleicos, sino también a las condiciones que prevalecen durante los pasos de lavado posteriores. Las condiciones de hibridación estrictas son, por ejemplo, condiciones en las que predominantemente solo hibridan aquellas moléculas de ácido nucleico que tienen al menos un 70%, preferiblemente al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de secuencia. Las condiciones de hibridación estrictas son, por ejemplo: hibridación en 4 x SSC a 65 °C seguida de múltiples lavados en 0,1 x SSC a 65 °C durante un total de aproximadamente 1 hora. El término «condiciones de hibridación estrictas» utilizado aquí también puede significar: hibridación a 68 °C en fosfato sódico de 0,25 M, pH 7,2, SDS al 7 %, EDTA de 1 mM y BSA

al 1 % durante 16 horas, seguida de dos lavados con 2 x SSC y SDS al 0,1 % a 68 °C. La hibridación se realiza preferentemente en condiciones estrictas.

El término «intervalo» o «intervalo cromosómico» significa un segmento lineal continuo en un ADN genómico que está presente en un cromosoma único en planta o en un fragmento cromosómico y que se define habitualmente por la indicación de dos marcadores que representan los puntos extremos del intervalo hacia el lado distal y proximal. Los marcadores que definen el final del intervalo también pueden formar parte del intervalo. Además, dos intervalos diferentes también pueden solaparse. En la descripción, un intervalo se especifica como «entre el marcador A y el marcador B». Un marcador terminal de un intervalo también puede localizarse en una región de marcadores definida a un lado del intervalo. Una región de marcadores se define entonces mediante la especificación de dos marcadores de flanco y representa un segmento cromosómico en la que pueden localizarse otros marcadores además de los marcadores de flanco. Los marcadores de flanco determinan los puntos finales de una región de marcadores y siguen formando parte de la región de marcadores. Si los dos marcadores finales de un intervalo son marcadores en regiones marcadoras diferentes a ambos lados de un intervalo, se especifica un intervalo en la descripción mediante la indicación «entre un marcador en una región marcadora X, que está flanqueada por los marcadores C y D, y un marcador en una región marcadora Y, que está flanqueada por los marcadores E y F». Una región marcadora puede extenderse hasta 500.000 pares de bases (pb), puede preferiblemente tener un tamaño de entre 100.000 y 400.000 pb o puede de modo particularmente preferible tener un tamaño de entre 140.000 y 315.000 pb.

En el contexto de la presente invención, «introgresión» se refiere a la transferencia de al menos un alelo genético deseado a un locus genético de un fondo genético a otro. Por ejemplo, una introgresión de un alelo genético deseado en un locus específico puede transferirse a una descendencia por cruce sexual entre dos progenitores de la misma especie. Alternativamente, por ejemplo, la transferencia de un alelo genético también puede producirse por recombinación entre dos genomas donantes en un protoplasto fusionado, en cuyo caso al menos un protoplasto donante porta el alelo genético deseado en su genoma. En cualquier caso, la progenie, que entonces comprende el alelo genético deseado, puede retrocruzarse repetidamente con una línea que tenga un excelente fondo genético y seleccionarse para el alelo genético deseado. El resultado es una fijación del alelo genético deseado en un fondo genético seleccionado.

El término «molécula de ácido nucleico aislada» o «polinucleótido aislado» se refiere a una molécula de ácido nucleico o polinucleótido que se ha retirado de su entorno natural u original. El término también comprende una molécula de ácido nucleico producida sintéticamente. El término «polipéptido aislado» se refiere a un polipéptido que ha sido separado de su entorno natural u original. El término también comprende un polipéptido producido sintéticamente.

Se entiende por «infección patógena» el momento más temprano en el que un patógeno interactúa con un tejido vegetal hospedero. Por ejemplo, en hongos como los ascomicetos u oomicetos, esto incluye el crecimiento de hifas o la formación de estructuras de infección específicas como hifas de penetración y apresorios. La infección por *Helminthosporium turcicum* ya puede investigarse en detalle utilizando diversas técnicas de tinción (por ejemplo, azul tripan) (Chung *et al.*, BMC Plant Biology 10 (2010), 103; Walsh *et al.* (2008), presentación de póster P192, 50ª Conferencia de Genética del Maíz en Washington D.C.).

«Donante Pepitilla», «Accesión Pepitilla» o «Pepitilla» se refiere no solo a la propia variedad autóctona Pepitilla, sino también a otros genotipos de maíz en cuyo genoma, en particular en el cromosoma 8 bin 5 o 6, se insertó preferentemente una introgresión del locus de resistencia HTN1 a partir de Pepitilla. Algunos ejemplos son W22Htn (por ejemplo, Bar-Zur *et al.*, 1998), H6314Htn (por ejemplo, Bar-Zur *et al.*, 1998), B73Htn (por ejemplo, Shimoni *et al.*, Journal of Phytopathology 131:4 (1991), 315-321), B68Htn y A632Htn (por ejemplo, Carson, Plant Disease 79 (1995), 717-720) y A619Htn (por ejemplo, Stankovic *et al.*, Genetika 39:2 (2007), 227 -240). Además, Pepitilla excluye cualquier fuente de resistencia que proporcione el fenotipo de resistencia con los rasgos típicos de HTN1 tras la introgresión en una línea/planta de maíz susceptible. Estos rasgos típicos de HTN1 incluyen, por ejemplo, retraso en el inicio de la esporulación, desarrollo reducido de lesiones, desarrollo de lesiones más pequeñas, zonas de esporulación reducidas y/o ausencia de lesiones cloróticas-necróticas o solo lesiones cloróticas-necróticas aisladas.

Un «locus» es una posición en un cromosoma donde se encuentran uno o más genes que causan o influyen en un rasgo agronómico. En particular, locus significa aquí el locus de resistencia HTN1, que proporciona resistencia frente al patógeno *Helminthosporium turcicum* o al menos frente a una raza de *Helminthosporium turcicum*.

Se entiende por «planta de maíz» una planta de la especie *Zea mays* y sus subespecies como *Zea mays* ssp. *mays*, *Zea mays* ssp. *mexicana* o *Zea mays* ssp. *parviglumis*.

Un «marcador» es una secuencia de nucleótidos que se utiliza como punto de referencia o de orientación. Un marcador para reconocer un evento de recombinación debe ser adecuado de vigilar diferencias o polimorfismos dentro de una población de plantas. En el caso de los marcadores, estas diferencias se encuentran a nivel del

ADN y son, por ejemplo, diferencias de secuencia de polinucleótidos como, por ejemplo, SSR (repeticiones de secuencia simple), RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), FLP (polimorfismos de longitud de fragmentos) o SNP (polimorfismos de nucleótido único). Los marcadores pueden derivarse de ácidos nucleicos genómicos o expresados, como ARN empalmado, ADNc o EST, y también pueden referirse a ácidos nucleicos que se utilizan como sondas o pares de cebadores y, como tales, son adecuados para amplificar un fragmento de secuencia utilizando procedimientos basados en la PCR. Los marcadores relativos a polimorfismos genéticos entre partes de una población pueden detectarse utilizando procedimientos establecidos del estado de la técnica (An Introduction to Genetic Analysis. 7ª edición, Griffiths, Miller, Suzuki *et al.*, 2000). Entre ellos se incluyen, por ejemplo: Secuenciación del ADN, amplificación específica de la secuencia, basada en la PCR, detección de RFLP, detección de polimorfismos polinucleotídicos mediante hibridación alelo-específica (ASH), detección de SSR, SNP o AFLP. Además, también se conocen procedimientos para la detección de EST (etiquetas de secuencia expresada) y RAPD (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente). Dependiendo del contexto, el término marcador en la descripción también puede significar una posición cromosómica específica en el genoma de una especie donde se puede encontrar un marcador específico (por ejemplo, SNP). Dicha posición de marcador puede utilizarse para rastrear la presencia de un locus ligado, por ejemplo, un locus ligado que contribuye a la expresión de un rasgo fenotípico determinado (por ejemplo, HTN1 o arrastre de enlace). Por ejemplo, el locus marcador también puede utilizarse para observar la segregación de alelos en un locus (QTL o gen único) que están, genética o físicamente, estrechamente ligados a la posición del marcador.

«Operacionalmente ligado» significa ligado en una molécula de ácido nucleico común de tal manera que los elementos ligados están posicionados y orientados uno con respecto al otro de tal manera que puede tener lugar la transcripción de la molécula de ácido nucleico. Un ADN que está operativamente ligado a un promotor está bajo el control transcripcional de este promotor.

Por «órganos» vegetales se entienden, por ejemplo, hojas, tallo, tronco, raíces, yemas vegetativas, meristemas, embriones, anteras, óvulos o frutos. Por «partes» vegetales se entiende una asociación de varios órganos, por ejemplo, una flor o una semilla, o una parte de un órgano, por ejemplo, una sección transversal del tallo. Los «tejidos» vegetales son, por ejemplo, el tejido de callo, el tejido de almacenamiento, el tejido meristemático, el tejido foliar, el tejido de brote, el tejido radicular, el tejido tumoral vegetal o el tejido reproductivo. Por «células» vegetales se entienden, por ejemplo, células aisladas con una pared celular o agregados de las mismas o protoplastos.

Una «planta» en el sentido de la invención puede ser de cualquier especie de las dicotiledóneas, monocotiledóneas y gimnospermas, a menos que se especifique lo contrario. Preferentemente, las plantas son monocotiledóneas y son de interés en agricultura u horticultura o para la generación de bioenergía (bioetanol, biogás, etc.). Se trata, por ejemplo, de *Gossypium* sp., *Zea mays*, *Brachypodium distachyon*, *Triticum* sp., *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Sorghum* sp., *Musa* sp., *Saccharum officinarum*, *Secale cereale*, *Avena* sp., césped y gramíneas forrajeras. Una planta según la invención es preferiblemente una planta del género *Zea*, en particular de la especie *Zea mays*, o sorgo.

En el contexto de la presente invención, el término «secuencia reguladora» se refiere a una secuencia de nucleótidos que influye en la especificidad y/o el nivel de expresión, por ejemplo, en que la secuencia reguladora proporciona una cierta especificidad tisular. Dicha secuencia reguladora puede estar situada en corriente arriba del punto de inicio de la transcripción de un promotor mínimo, pero también corriente abajo de éste, por ejemplo, en una secuencia líder transcrita, pero no traducida, o dentro de un intrón.

El término «resistencia» o «resistente» frente a un patógeno debe entenderse como la resistencia de una planta o célula vegetal frente a las influencias nocivas del patógeno y se extiende desde un retraso en el desarrollo de la enfermedad hasta una supresión completa del desarrollo de la enfermedad. En el contexto de la presente invención, una planta o célula vegetal es resistente o una planta o célula vegetal posee resistencia frente al patógeno *Helminthosporium turcicum* (*H. turcicum* o Ht), es decir, a la enfermedad foliar del tizón septentrional de la hoja del maíz (NCLB, por Northern Corn Leaf Blight). La resistencia está proporcionada por una o más proteínas codificadas por un gen o genes (genes que proporcionan resistencia) de la accesión Pepitilla. La resistencia puede ser completa o parcial y puede estar marcada específicamente por la raza del patógeno o no específicamente por la raza del patógeno. En el caso de la resistencia específica de la raza del patógeno, las razas virulentas de *Helminthosporium turcicum* pueden incluir, por ejemplo, N, 1N, 2N, 23N o 123N, mientras que las razas avirulentas pueden incluir, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 12, 23 o 123. Una resistencia proporcionada puede ser una resistencia recién adquirida o el aumento de una resistencia parcial ya existente.

Una «planta transgénica» se refiere a una planta en cuyo genoma está integrado al menos un polinucleótido, preferiblemente un polinucleótido heterólogo. Preferiblemente, el polinucleótido está integrado de forma estable, lo que significa que el polinucleótido integrado se mantiene de forma estable en la planta, se expresa y también puede ser heredado de forma estable por la progenie. La introducción estable de un polinucleótido en el genoma de una planta también incluye la integración en el genoma de una planta de la generación parental anterior, en cuyo caso el polinucleótido puede seguir transmitiéndose de forma estable. El término «heterólogo»

significa que el polinucleótido introducido proviene, por ejemplo, de una célula o un organismo con un fondo genético diferente de la misma especie o de una especie diferente, o es homólogo a la célula hospedera procarionta o eucariota, pero se localiza en un entorno genético diferente y, por tanto, difiere de cualquier polinucleótido correspondiente presente de forma natural. Un polinucleótido heterólogo puede estar presente además de un gen endógeno correspondiente.

Las configuraciones y formas de realización de la presente invención se describen a modo de ejemplo con referencia a las figuras y secuencias adjuntas:

Figura 1: Región QTL calculada de 23,1 cM en el cromosoma 8 utilizando 8 marcadores en 528 individuos F2 del cruce RP1 x RP1 HTN1. La barra negra (HtN) indica el intervalo de confianza. Indicación de posición de los marcadores en cM.

Figura 2: Ensayo de rendimiento de ensilado en 5 localidades de Alemania y en dos repeticiones con el progenitor recurrente RP3 y la versión A del fragmento donante de B37HTN1 (RP3HTNA) y la versión K del fragmento donante de B37HTN1 (RP3HTNK). Las barras indican diferencias significativas según la prueba t con $p=0,05$.

Figura 3: Descripción de las regiones marcadoras M1 a M6, que definen los intervalos cromosómicos (Int. 1 a Int. 5) que tienen el polinucleótido proveedor de la resistencia en las líneas de introgresión y llevan el arrastre de enlace en el fragmento cromosómico proveniente del donante. Los segmentos cromosómicos del donante 'Pepitilla' están punteados, los del progenitor recurrente (sin arrastre de enlace) se muestran rayados en diagonal. El intervalo 1 (Int. 1) comprende el locus de resistencia HTN1, el intervalo 2 (Int. 2) comprende regiones de secuencias que son responsables del arrastre de enlace del tiempo de floración en el donante, los intervalos 4 y 5 (Int. 4 e Int. 5) comprenden regiones de secuencias que son responsables del arrastre de enlace del rendimiento de ensilado en el donante.

Figura 4: BAC-contig en su banco de BAC RP4HTN1 con el correspondiente andamiaje de secuencias y anotaciones de genes. Los genes candidatos se muestran como recuadros a cuadros. Las flechas negras representan genes adicionales anotados que no son genes candidatos de la resistencia a HTN.

1. Experimentos de fenotipado

A) Realización de experimentos de campo para determinar la resistencia a HT bajo inoculación/infección natural y artificial y época de floración:

En cada localización se plantaron en hilera al menos 20 individuos por genotipo de maíz a analizar. La inoculación se realizó de forma natural o artificial. La inoculación/infección natural se llevó a cabo mediante esporas naturales de *H. turcicum*. La inoculación/infección artificial se llevó a cabo utilizando material foliar infectado y molido, que se aplicó a las plantas objeto de la investigación. Este último tipo de inoculación permitió simular una infestación comparable por *H. turcicum* en diferentes años de prueba y en diferentes lugares, independientemente de las condiciones de infestación natural respectivamente predominantes. Un progenitor susceptible y un progenitor con HTN1-Introgresión del donante B37HTN1 se cultivaron como genotipos de control según la población cruzada investigada. La evaluación del rasgo de resistencia HT tuvo lugar al menos tres veces durante el periodo vegetativo. El esquema de evaluación uniformemente utilizado se muestra en la Tabla 3.

El donante B37HTN1 como fuente de resistencia a HT se cruzó con diferentes fondos genéticos de líneas de élite con diversos grados de susceptibilidad a *H. turcicum* y se desarrollaron líneas casi isogénicas, que difieren de las líneas parentales susceptibles esencialmente solo en la introgresión de B37HTN1. En experimentos de fenotipado, tras la inoculación artificial descrita anteriormente, se seleccionaron líneas que mostraban una mejora en la resistencia a HT de al menos 2 a 3 puntos de evaluación, preferiblemente de 3 a 4 puntos de evaluación, mediante la introducción de la introgresión de B37HTN1 que proporciona resistencia. A modo de ejemplo, la presente invención se describe con más detalle a continuación utilizando los dos progenitores recurrentes seleccionados RP1 y RP3. Los resultados de los experimentos de fenotipado mencionados se resumen en la Tabla 5. El progenitor recurrente RP1 sin introgresión mostró notas de evaluación medias de 7 a 9, que mejoraron en 3 a 4 notas de evaluación por la introgresión de B37HTN1. El progenitor recurrente RP3 mostró notas de evaluación entre 4 y 6 sin introgresión y una mejora en 2 a 3 notas de evaluación debido a la introgresión. El progenitor recurrente RP4 mostró una nota de evaluación de 6 sin introgresión y una mejora en 2-3 notas de evaluación debido a la introgresión.

Tabla 5: Datos de fenotipado sobre la resistencia a HT de los genotipos RP1, RP3 y RP4 con y sin introgresión proveedora de resistencia de B37HTN1 (las notas de evaluación se determinaron según el esquema de la Tabla 3).

Genotipo	Notas de evaluación medias (n=20) sin introgresión de B37HTN1	Mejora de la resistencia a HT con introgresión de B37HTN1
RP1	7 a 9	3 a 4
RP3	4 a 6	2 a 3
RP4	6	2 a 3

Además de la resistencia a HT, también se registró para cada genotipo el tiempo de floración femenina y masculina en días después de la siembra. El momento de la floración femenina se determina por la aparición de los hilos del estigma, mientras que el momento de la floración masculina se determina por la aparición de la panícula. Los resultados se describen con más detalle en el ejemplo 3. B).

B) Realización de ensayos de campo para determinar el rendimiento en grano y ensilado:

Además de los datos anteriores sobre resistencia a HT y tiempo de floración, se determinaron datos de rendimiento para RP3, que contenía diferentes longitudes de fragmentos de introgresión que proporcionan resistencia de B37HTN1 y Pepitilla, respectivamente, y para una línea élite comparativa. Las líneas RP3, RP3HTNA y RP3HTNK se polinizaron con un probador (maíz flint, cruce simple interpool) del acervo genético complementario (maíz flint) para generar semillas para híbridos de prueba. Cada uno de estos híbridos de prueba se cultivó por duplicado en un ensayo de campo en cinco lugares de Alemania representativos del cultivo de maíz. Los híbridos de prueba están bien adaptados a esta región de cultivo en términos de madurez. El ensayo de campo se realizó en dos repeticiones en parcelas de 4 hileras con una longitud de 6 metros y una separación entre hileras de 0,75 metros. La densidad de plantación fue de 9 plantas por m² en la primera y de 11 plantas por m² en la segunda repetición. En el momento de la madurez del maíz para ensilado solo se cosecharon las dos hileras centrales de cada parcela para minimizar los efectos de la competencia. En el cultivo cosechado se determinó el peso por parcela y el contenido de agua para calcular el rendimiento de maíz ensilado (también conocido como rendimiento de ensilado o rendimiento total de materia seca) y el contenido total de materia seca (Total Dry Matter Content).

C) Realización de ensayos en invernadero para determinar la resistencia a HT:

Se cultivaron 20 individuos por genotipo en macetas. Como controles sirvieron genotipos de un progenitor susceptible y de un progenitor casi isogénico (NIL) con introgresión proporcionada por resistencia a partir de B37HTN1, dependiendo del cruce. La infección artificial se produjo 14 días después de la siembra (véase más arriba). Transcurridas de 2 a 3 semanas se desarrollaron los primeros síntomas de la enfermedad. A partir del momento en que aparecieron los primeros síntomas, se registraron cada dos días las notas de evaluación del rasgo de resistencia HT y el número de plantas con síntomas. A partir de ahí se determinó el AUDPC (area under disease progress curve o área bajo la curva de progreso de la enfermedad). La frecuencia de infestación (en %/tiempo x periodo) se utilizó para categorizar las plantas estudiadas, correspondiendo el AUDPC a 0 - 100 resistentes, 101 - 450 heterocigotas, y > 450 susceptibles.

2. Desarrollo de marcadores para la región diana HTN1

Además de los experimentos de evaluación, la región diana alrededor del locus de resistencia HTN1 en el cromosoma 8 (bin 8.06) se examinó con más detalle y se cartografió en numerosos genotipos utilizando marcadores moleculares nuevos y/u optimizados. Los marcadores moleculares utilizados para este fin se desarrollaron a partir de polimorfismos de nucleótido único (SNP) o de marcadores de repetición de secuencia simple (SSR) ya disponibles públicamente:

El ADN de los genotipos para la aplicación de los marcadores se aisló utilizando el procedimiento NucleoSpin 96 Plant II según las instrucciones del fabricante (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Alemania) o utilizando el procedimiento Klear Gene DNA Extraction 384 (LGC Genomics GmbH, Alemania).

Las secuencias de cebadores de los marcadores SSR ya se conocían de la base de datos pública del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>; las secuencias de cebadores de los marcadores bnl1782, umc1960, bnl240, umc1121, bnl1067 y umc1287, que se utilizaron para investigar la región diana, junto con las modificaciones realizadas se recopilan en la Tabla 6.

Tabla 6: Secuencias de cebadores de los marcadores SSR (NED: 2'-cloro-5'-fluoro-7',8'-fusionado fenil-1.4-dicloro-6-carboxifluoresceína; FAM: 6-carboxifluoresceína; M13: secuencia central del fago M13)

Marcador	Secuencia del cebador hacia delante (5'-3') [SEQ ID NO]	Modificación	Secuencia del cebador inverso (5'-3') [SEQ ID NO]	Modificación	Cebador adicional + modificación
bnlg1782	113	NED	114	Ninguna	

umc1960	115	NED	116	Ninguna	
bnlg240	117	FAM	118	Ninguna	
umc1121	119	FAM	120	Ninguna	
bnlg1067	121	FAM	122	Ninguna	
umc1287	123	Ninguna	124	Ninguna	M13 + FAM

La mezcla de reacción de PCR de bnlg1782, umc1960, bnlg240, umc1121 y bnlg1067 comprendía 10 µl y consistía en una única concentración de 4x ReguladorB (Solis BioDyne, Estonia), 0,5 pmol de cebador directo, 0,5 pmol de cebador inverso, 10-30 ng de ADN, 0,25 unidades de HotFirepol TAQ polimerasa (Solis BioDyne, Estonia). La mezcla de reacción de umc1287 comprendía 10 µl y consistía en una única concentración de 4x ReguladorB (Solis BioDyne, Estonia), 0,5 pmol del cebador directo, 2,5 pmol del cebador inverso, 0,3 pmol del cebador adicional M13, 10-30 ng de ADN, 0,25 unidades de HotFirepol TAQ polimerasa (Solis BioDyne, Estonia).

La reacción de PCR se realizó con un tiempo de desnaturalización inicial de 900 segundos a 94 °C, un ciclo de amplificación de 25-40 ciclos con 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50-55 °C y 120 segundos a 72 °C, y un paso final durante 300 segundos a 72 °C. A continuación, la reacción de PCR se incubó durante 2 horas a 65 °C. Los productos de la PCR se separaron en un ABI3730xl (Life Technologies™, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante para la separación de fragmentos de 50-400 pb.

Los marcadores SNP se desarrollaron y utilizaron (a) a partir de recursos disponibles públicamente, (b) a partir de secuenciación comparativa de amplicones o (c) a partir de una comparación de secuencias de BAC de RP4HTN1 (véase la sección Análisis molecular) y del genoma de referencia AGPv02 de B73 (www.maizesequence.org).

(a) Los SNP se convirtieron en marcadores KASP (LGC Genomics GmbH, Alemania) a partir del recurso SNP disponible públicamente del chip 50K-Illumina de la comunidad del maíz (Ganal *et al.*, 2011). Para ello, se desarrollaron nuevos cebadores que garantizaban la amplificación de los alelos cruciales en el ensayo de marcadores KASP (véase la Tabla 4). Todo el flujo de trabajo se realizó utilizando el software Kraken™ (LGC Genomics GmbH, Alemania). Para un ensayo de marcadores KASP se utilizaron 5-20 ng de ADN, 0,02 µl de una mezcla de oligo- ensayo (12 µM de cebador alelo 1 (hacia delante); 12 µM de cebador alelo 2 (hacia delante); 30 µM de cebador inverso) y 1,5 µl de un kit de reactivos 1xKASPar para placas 1536. Una configuración estándar de PCR consistió en 94°C durante 15 minutos, 10 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 61-55°C touch down (puesta en tierra) durante 1 minuto, 26 ciclos de 94°C durante 20 segundos y 55°C durante 1 minuto. Los alelos por genotipo se evaluaron utilizando el software Kraken™ (LGC Genomics GmbH, Alemania).

(b) La secuenciación comparativa de amplicones se realizó mediante secuenciación Sanger. Los genotipos de la secuenciación comparativa comprendieron respectivamente el donante B37HTN1, así como B37, RP1, RP1HTN1, RP3, RP3HTN1 (versiones A, B, K), RP4, RP4HTN1. El ADN se aisló de granos molidos mediante el procedimiento CTAB (Maniatis *et al.*, 1982). Las secuencias de los cebadores para la secuenciación de los amplicones figuran en la Tabla 4. Un protocolo estándar de PCR para la amplificación de las regiones correspondientes consistió en desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos y un paso final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se secuenciaron mediante el procedimiento de Sanger (Sanger & Coulson, 1975). La evaluación de la secuencia se realizó con el programa informático DNASTar Lasergene (DNASTAR Inc., EE.UU.). Los polimorfismos detectados se convirtieron en marcadores KASP como se describe en (a).

(c) Los contigs de la secuencia BAC se proyectaron contra el genoma de referencia B73 AGPv02 utilizando el algoritmo blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para detectar polimorfismos de nucleótido único (SNP). Los polimorfismos se detectaron con el software Lasergene (DNASTAR Inc., EE.UU.) y se enumeran junto con las secuencias flanqueadoras en la Tabla 4. Se desarrollaron cebadores para las secuencias flanqueadoras de un SNP y los SNP identificados se convirtieron en marcadores KASP como se describe en (a).

3. Localización del locus de resistencia HTN1 en el cromosoma 8 utilizando los marcadores SSR

A) Localización del locus de resistencia HTN1:

El locus de resistencia HTN1 de los donantes B37HTN1 se cruzó en líneas de élite como se describe en el Ejemplo 1.A) y se localizó en el cromosoma 8 (bin 8.06) utilizando los marcadores SSR y SNP del Ejemplo 2. (véase la Figura 1). Las NIL de los cruces RP1 x RP1 HTN1 y RP3 x RP3HTN1 se fenotiparon en dos localizaciones a lo largo de varios años con dos repeticiones en condiciones de infección natural según el esquema de evaluación de la Tabla 3. En término medio, las NIL mostraron una respuesta de resistencia mejorada en 4 notas de evaluación en comparación con la línea original. El desarrollo de las lesiones localizadas en las hojas se desplazó unas 2 semanas en comparación con el genotipo susceptible. El mapeo

QTL se realizó con 528 individuos F2 (cruce RP1 x RP1 HTN1) utilizando los 8 marcadores (de la Figura 1 mapeo QTL - los marcadores se enumeran en las Tablas 4 y 6). La región QTL que comprende el locus de resistencia HTN1 se localizó en el cromosoma 8 entre los marcadores MA0002 y umc1287 en una región de 23,1 cm.

- 5 B) Cruce del fragmento donante B37HTN1 en una línea élite de maíz e identificación y eliminación del arrastre de enlace para el retraso del tiempo de floración:

El donante B37HTN1 se cruzó con KWS.elite, una línea de maíz de élite de KWS SAAT AG (Alemania) y se retrocruzó con KWS.elite de forma continuada durante cinco generaciones. En cada generación de retrocruzamiento se utilizaron marcadores moleculares para seleccionar plantas heterocigóticas para la región diana HTN. Posteriormente se autofecundó continuamente una planta seleccionada de la quinta generación de retrocruzamiento y se utilizaron marcadores moleculares para identificar plantas homocigóticas para la región diana HTN.

Estas líneas se probaron en ensayos de campo en varios lugares. Los datos fenotípicos de resistencia a HT y tiempos de floración se registraron para los genotipos B37HTN1, KWS.elite y KWS.elite.B37HTN1 como se describe en el ejemplo 1. Los genotipos con introgresión HTN1 mostraron la resistencia a HT esperada con notas de evaluación de 1 a 3, mientras que la línea original KWS.elite recibió notas de evaluación de 5-7. Inesperadamente, KWS.elite.B37HTN1 también mostró un retraso de al menos 2 días en la floración tanto femenina como masculina en comparación con KWS.elite. Estas tiempos de floración desplazados representan un rasgo agronómico negativo para el maíz basado en el arrastre de enlace, que aún no se ha descrito de esta forma tras la introgresión de la resistencia HT de B37HTN1. Los análisis de marcadores permitieron localizar el arrastre de enlace, responsable del retraso de la floración, en una región entre dos regiones de marcadores en la introgresión a partir de B37HTN1, entre M1 y M2. Para ello, se analizaron los genotipos B37HTN1, KWS.elite y KWS.elite.B37HTN1, por ejemplo, con los marcadores KASP SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 y PZE-108077560 (véanse la Figura 3 y la Tabla 4). SYN14136 y PZE-108076510 se utilizaron para la detección específica de la región marcadora M1, SYN24931 y PZE-108077560 para la detección específica de la región M2. Por consiguiente, la región marcadora M1 está situada a 5' del locus del arrastre de enlace y la región marcadora M2 a 3' del mismo. El análisis de marcadores mostró que B37HTN1 y KWS.elite.B37HTN1, ambos con floración dos días más tardía, mostraron alelos comunes para las regiones M1 y M2 y para el intervalo entre estas regiones, mientras que KWS.elite con un tiempo de floración normal presentaba alelos diferentes para las regiones M1 y M2 y el intervalo entre ellas.

El donante B37HTN1 se cruzó con RP3 y se retrocruzó con RP3 durante tres generaciones. Se utilizaron marcadores moleculares en cada generación de retrocruzamiento. En primer lugar, se seleccionaron plantas heterocigotas para la región diana HTN1 y, a continuación, estas plantas se analizaron con marcadores distribuidos uniformemente por todo el genoma para seleccionar contra el genoma donante. Posteriormente, una planta seleccionada de la tercera generación de retrocruzamiento se autofecundó continuamente y se utilizaron marcadores moleculares para identificar plantas homocigóticas para la región diana HTN1.

Además, el donante B37HTN1 también se cruzó con los progenitores recurrentes RP3 y RP4 y se generó una línea RP3HTNA y RP4HTNA mediante varios pasos de retrocruzamiento. El fenotipado para la resistencia a la HT mostró una mejora de las notas de evaluación de 5 a 7 para la línea de partida RP3 a 1 a 3 para RP3HTNA y una mejora de las notas de evaluación de 6 para la línea de partida RP4 a 2 a 3 para RP4HTNA. El fenotipado de los tiempos de floración mostró tiempos de floración comparables para RP3 y RP3HTNA y RP4 y RP4HTNA. Mediante el uso de los marcadores KASP SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 y PZE-108077560 se pudo demostrar que RP3 y RP3HTNA portan alelos comunes para las regiones M1 y M2. Estos no correspondían al donante B37HTN1. Como resultado, el segmento cromosómico de retraso del tiempo de floración de la introgresión de B37HTN1 se encuentra en un intervalo cromosómico entre las regiones marcadoras M1 y M2. De este modo, con la línea RP3HTNA fue posible eliminar este arrastre de enlace. Los marcadores KASP SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 y PZE-108077560 utilizados demostraron ser herramientas eficaces para la «selección asistida».

El fenotipado de RP3 y RP3HTNA también incluyó el registro del rendimiento en grano y ensilado. Mientras que el rendimiento en grano no fue significativamente diferente en los genotipos, el rasgo de rendimiento en ensilado en RP3HTNA mostró una clara reducción estadísticamente verificable de al menos 14 decitonas por hectárea (dt/ha) en comparación con RP3, o una reducción de más del 5%.

Con la ayuda de los marcadores KASP desarrollados SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 y PZE-108077560, se pudo seleccionar una línea RP1HTN1 a partir del cruce de B37HTN1 y el progenitor recurrente RP1, que ya no presentaba un arrastre de enlace que retrasaba el tiempo de floración, pero que también mostraba una reducción del rendimiento de ensilado como la observada para RP3HTNA. Para refinar la caracterización molecular, se siguió desarrollando RP1HTN1 y se creó una población F2 con 724 individuos a partir del cruce RP1 x RP1 HTN1. Posteriormente, se autofecundó la generación F3 y se genotipificaron y fenotipificaron plantas F4 seleccionadas. El genotipado se llevó a cabo utilizando marcadores de la Tabla 6 en

la región QTL detectada de 23,1 cM. El fenotipado se llevó a cabo en varias localizaciones en dos repeticiones (véase el ejemplo 1.). Se seleccionaron plantas recombinantes para la región QTL y se correlacionaron con los datos fenotípicos. La selección comprendió plantas que cubrían diferentes partes de la región diana, así como plantas heterocigóticas con el objetivo de obtener nuevas plantas recombinantes. Cada año se realizaron dos retrocruzamientos con RP1 y plantas individuales seleccionadas para crear nuevas recombinantes. Las nuevas recombinantes se fenotiparon en ensayos de campo y de invernadero (véase 1.) y se genotiparon para el desarrollo de nuevos marcadores moleculares según 2.

La aplicación de estos nuevos marcadores al genotipo RP3HTNA permitió identificar una región marcadora M3, que limita la introgresión en la región 5' y puede describirse con los marcadores flanqueadores PZE-108093423 y PZE-108093748. En esto, PZE-108093423 debería contener el alelo del progenitor recurrente RP3 y PZE-108093748 el alelo del donante B37HTN1. En la región 3', la introgresión de RP3HTNA se describe mediante los marcadores PZE-108107671 y SYN4196 en otra región de marcadores M6 (véase la figura 3). En esto, PZE-108107671 porta el alelo del donante B37HTN1 y SYN4196 el alelo del progenitor recurrente RP3. La introgresión de RP3HTNA (en adelante denominada versión A) corresponde al donante B37HTN1 entre las regiones marcadoras M3 y M6, pero fuera de esta región al progenitor recurrente, o a otra línea que no porta los alelos en la región entre M1 y M2 del donante B37HTN1. Esta versión A se introdujo en varios otros fondos genéticos y se sometió de nuevo a pruebas de rendimiento, fenotipado de resistencia y determinación del tiempo de floración. Los resultados fueron comparables a los descritos para RP3HTNA. Así, el tiempo de floración no se desplazó en comparación con la línea correspondiente sin introgresión y la línea mostró una resistencia mejorada frente a *Helminthosporium turcicum* en comparación con la línea de partida, aunque sí mostró una reducción en el rendimiento de ensilado.

C) Identificación y eliminación del arrastre de enlace para la reducción del rendimiento de ensilado:

Se utilizó la línea RP3HTNA como donante. Esta línea se cruzó con RP3 y se autofecundó continuamente durante seis generaciones. En cada generación de autofecundación se utilizaron marcadores moleculares en la región objetivo para reducir el tamaño del fragmento donante. Dado que todas las regiones del genoma fuera de la región diana ya habían sido seleccionadas para el genoma RP3 en la línea RP3HTNA, solo se analizó con marcadores la región alrededor de la región diana HTN. Se identificaron plantas homocigóticas para una región diana HTN reducida. Al mismo tiempo tuvo lugar un desarrollo intensivo de marcadores en la región diana. Entre muchos otros, fue posible identificar una línea RP3HTNK, que contiene el fragmento donante B37HTN1 de una región marcadora M4, flanqueada por los marcadores MA0004 y MA0005, en cuyo caso MA0004 describe el alelo del progenitor recurrente RP3 y MA0005 el alelo del donante B37HTN1 en RP3HTNK, hasta una región marcadora M5, flanqueada por los marcadores MA0006 y PZE-108097482, en cuyo caso MA0006 describe el alelo del donante B37HTN1 y PZE-108097482 el alelo del progenitor recurrente RP3. En RP3HTNK, la introgresión de RP3HTNK (en lo sucesivo, la versión K) provoca una mejora de la resistencia a HTN1 de 3 a 4 notas de evaluación en comparación con RP3, el mismo tiempo de floración que su línea de partida RP3 (sin retraso en la floración) y ninguna reducción significativa del rendimiento de ensilado (véase la Figura 2). Con la ayuda de los marcadores descritos, también se pudieron crear líneas libres de arrastre de enlace desde la línea de partida RP1 mediante cruzamiento, que mostró la versión K de la introgresión.

D) Haplotipo que proporciona resistencia a partir de B37HTN1 o de Pepitilla

La versión K tiene un haplotipo procedente de B37HTN1 o de Pepitilla, que lleva los alelos donantes descritos en la Tabla 4 a las posiciones físicas relacionadas con B73 AGPv02 en pb. La descripción del haplotipo se describe aquí utilizando el marcador MA0008 como ejemplo: si se utiliza el marcador MA0008 y se determinan los alelos para B37HTN1, RP3, RP3HTNA, RP3HTNK, se determina el alelo «T» para B37HTN1, RP3HTNA, RP3HTNK y el alelo «C» para RP3. Para este locus, este marcador también distingue la presunta fuente de resistencia HTN1 PH99N (WO 2011/163590), que también contiene un alelo «C» en esta posición, de la fuente de resistencia utilizada aquí.

4. Análisis molecular de la región finamente cartografiada

Además, el fragmento cromosómico insertado y truncado por introgresión se analizó molecularmente. El locus de resistencia HTN1 de la accesión Pepitilla se redujo así a una región diana distinta, un intervalo cromosómico de 700 kb, y se secuenció en el genotipo RP4HTN1. Como se describe con más detalle a continuación, se aislaron clones BAC de RP4HTN1, se secuenciaron y se ensamblaron en un andamiaje de secuencias. El andamiaje de secuencias se anotó y los genes anotados de este intervalo se compararon con la información de secuencias EST/ADN. Luego se identificaron genes candidatos a partir de un gran número de genes anotados mediante estudios de expresión diferencial (véase la Tabla 1).

A) Creación del banco y reserva de BACs, calificación del banco de BACs, secuenciación de BACs

Se creó un banco de BAC a partir del genotipo RP4HTN1. El banco de BAC y las reservas de matrices 3D se crearon a partir de material foliar y se seleccionaron las reservas de matrices 3D. Los cebadores para la

selección de los reservas de matriz 3D se seleccionaron sobre la base de la secuencia AGPv01 de B73 de 149957158 pb a 152977351 pb en el cromosoma 8 (www.maizesequence.org) y el programa Primer 3 (<http://simgene.com/Primer3>; Rozen & Skaletsky, 2000). Los parámetros para la selección de los cebadores fueron un contenido medio de GC del 50%, una longitud de cebador de 20-25 pb, una temperatura de fusión entre 70-90°C y una longitud de amplicón entre 70-80 pb. Los pares de cebadores de la Tabla 7 se utilizaron para seleccionar los reservas 3D mediante RT-PCR. Los valores de los dos parámetros temperatura de fusión y valor CP se indican para los clones BAC. Se identificaron 26 clones BAC para la región seleccionada. Todos los clones BAC se aislaron del banco de BAC y se utilizaron como cultivo de *E. coli* para el aislamiento y la secuenciación del ADN. La secuenciación se llevó a cabo utilizando una serie estándar GS-FLX Titanium (454 Life Sciences, EE.UU.). La información sobre la secuencia obtenida de los clones BAC 144N24, 119F13, 219G11, 86N21, 16B06, 84L18, 128D02, 25M23, 96H10, 19J24, 136A01, 75H06, 135F07 se recopila en la Tabla 8.

Tabla 7: Pares de cebadores para la detección de clones BAC del banco BAC RP4HTN

Clon BAC ID	Par de cebadores 1 Par de cebadores 2	Secuencia par de cebadores de 1 (5'-3')	Temperatura de fusión °C (50% del amplicón es monocatenario) en el genotipo RP4HTN1	Valor CP (ciclo, si comienza la fase exponencial de la PCR)	Tamaño del amplicón (pb)
58A14	579ZMPM0_2F; 579ZMPM0 2R	125; 126	77,4	28,5	74
	579ZMPM0_4F; 579ZMPM0 4R	127; 128	80,96	26,52	77
144N24	579ZMPM0_5F; 579ZMPM0 5R	129; 130	79,09	27,09	76
	579ZMPM0_17F; 579ZMPM0 17R	131; 132	83,06	25,53	78
219G11	579ZMPM0_16F; 579ZMPM0 16R	133; 134	84,7	25,96	78
	579ZMPM0_25F; 579ZMPM0 25R	135; 136	78,95	26,09	80
119F13	579ZMPM0_22F; 579ZMPM0 22R	137; 138	80,89	25,98	73
	579ZMPM0_34F; 579ZMPM0 34R	139; 140	80,1	24,43	76
86N21	579ZMPM0_35F; 579ZMPM0 35R	141; 142	80,9	25,27	70
	579ZMPM0_38F; 579ZMPM0 38R	143; 144	83,86	26,01	71
16B6	579ZMPM0_37F; 579ZMPM037R	145; 146	79,22	25,71	80
	579ZMPM0_41F; 579ZMPM0 41R	147; 148	75,93	26,6	74
84L18	579ZMPM0_41F; 579ZMPM0 41R	149; 150	75,93	26,6	74
	579ZMPM0_46F; 579ZMPM0 46R	151; 152	80,54	25,68	78
128D2	579ZMPM0_180F; 579ZMPM0180R2	153; 154	84,41	25,99	77
	579ZMPM0_48F; 579ZMPM0 48R	155; 156	83,96	25,33	77
25M23	579ZMPM0_48F; 579ZMPM0 48R	157; 158	83,96	25,33	77
	579ZMPM0_56F; 579ZMPM056R	159; 160	77	29,12	79
19J24	579ZMPM0_51F; 579ZMPM0 51R	161; 162	87,76	27,75	77
	579ZMPM0_199F; 579ZMPM0 199R	163; 164	82,49	26,56	79
96H10	579ZMPM0_63F; 579ZMPM0 63R	165; 166	85,78	26,08	63
	579ZMPM0_208F; 579ZMPM0 208R	167; 168	79,87	26,84	79

ES 2 987 427 T3

136A1	579ZMPM0_206F; 579ZMPM0_206R	169; 170	89,81	32,09	70
	579ZMPM0_86F; 579ZMPM086R	171; 172	81,81	30,07	71
135F7	579ZMPM0_79F; 579ZMPM0_79R	173; 174	75,82	25,43	72
	579ZMPM0_278F; 579ZMPM0_278R	175; 176	78,13	22,69	78
75H6	579ZMPM0_209F; 579ZMPM0_209R	177; 178	75,41	24,93	77
	579ZMPM0_86F; 579ZMPM086R	179; 180	81,81	30,07	71
11702	579ZMPM0_87F; 579ZMPM087R	181; 182	81,89	27,7	76
	579ZMPM0_91F; 579ZMPM091R	183; 184	80,13	26,93	75
173H23	579ZMPM0_216F; 579ZMPM0_216R	185; 186	82,3	25,76	80
	579ZMPM0_95F; 579ZMPM0_95R	187; 188	79,5	24,97	73
118N19	579ZMPM0_99F; 579ZMPM099R	189; 190	76,84	24,69	80
	579ZMPM0_244F; 579ZMPM0_244R	191; 192	80,07	25,38	80
42L23	579ZMPM0_241F; 579ZMPM0_241R	193; 194	81,16	25,79	79
	579ZMPM0_109F; 579ZMPM0_109R	195; 196	77,89	25,28	74
112N13	579ZMPM0_109F; 579ZMPM0109R	197; 198	77,89	25,28	74
	579ZMPM0_247F; 579ZMPM0_247R	199; 200	80,76	24,82	71
97K23	579ZMPM0_112F; 579ZMPM0_112R	201; 202	79,22	25,2	77
	579ZMPM0_125F; 579ZMPM0_125R	203; 204	83,44	28,17	74
18J17	579ZMPM0_253F; 579ZMPM0_253R	205; 206	77,5	32,34	71
	579ZMPM0_125F; 579ZMPM0_125R	207; 208	83,44	28,17	74
5M22	579ZMPM0_128F; 579ZMPM0_128R	209; 210	77,99	24,05	77
	579ZMPM0_136F; 579ZMPM0_136R	211; 212	78,65	26,46	78
146I6	579ZMPM0_131F; 579ZMPM0_131R	213; 214	76,58	26,54	78
	579ZMPM0_137F; 579ZMPM0_137R	215; 216	83,7	25,42	73
147015	579ZMPM0_138F; 579ZMPM0138R	217; 218	79,38	24,8	79
	579ZMPM0_147F; 579ZMPM0_147R	219; 220	79,63	26,77	80
88K17	579ZMPM0_145F; 579ZMPM0145R	221; 222	81,51	27,61	76
	579ZMPM0_262F; 579ZMPM0_262R	223; 224	75,7	25,82	80
180G22	579ZMPM0_161F; 579ZMPM0_161R	225; 226	80,21	25,16	73
	579ZMPM0_265F; 579ZMPM0_265R	227; 228	79,3	24,7	79

Tabla 8: Contenido de secuencias de los 13 clones BAC analizados

BAC	# Lecturas	# Lecturas sin <i>E.coli</i>	Cantidad de secuencias en pb	Cantidad de secuencia en pb sin <i>E.coli</i>
144N24	10967	10849	3646226	3591222
119F13	17987	17847	6033910	5957456
219G11	32904	32484	10553629	10381924
86N21	39606	39106	12991596	12750077
16B06	36198	35849	12523123	12357036
84L18	50537	34162	15991645	10776458
128D02	15998	15847	5138442	5064677
25M23	22551	22416	7864493	7786402
96H10	7723	7614	2569604	2525488
19J24	21953	21775	7327364	7234315
136A01	31998	31724	10298869	10158900
75H06	24345	24121	8021727	7920125
135F07	29702	29484	9721708	9604010

B) Ensamblaje de secuencias BAC, anotación y selección de genes candidatos:

- 5 Creación de un andamiaje de secuencias: los clones BAC 144N24, 119F13, 219G11, 86N21, 16B06, 84L18, 128D02, 25M23, 19J24, 96H10, 136A01, 75H06, 137F07 se secuenciaron mediante la técnica 454 (Margulies *et al.*, 2005).

El ensamblaje automático de las secuencias crudas de los clones BAC se realizó con el software «Newbler» (454 runAssembly software, software release 2.3). Los contigs de secuencias resultantes por BAC se dispusieron correctamente mediante análisis manual aplicando las técnicas siguientes:

- 10 1. Las secuencias de BAC solapadas podían clasificarse a grandes rasgos en regiones solapadas y no solapadas.
2. Los contigs de secuencias de diferentes BAC solapados se compararon en las regiones solapadas. Aproximadamente el 20% de los contigs de secuencias podían disponerse de este modo y podían cerrarse los huecos entre ellos (por ejemplo, si un contig de un BAC cubre o conecta dos contigs del otro BAC).
- 15 3. Todos los contigs de secuencias se anotaron manualmente. Inicialmente, solo se anotaron los elementos repetitivos (transposones y retrotransposones, «TEs» para abreviar). Dado que los huecos de secuencia se producen principalmente en los TE, la anotación de TE puede ayudar a disponer correctamente los contigs de secuencia. Esto significa que, si un extremo de un TE se encuentra en un contig de secuencia y el otro extremo en otro, los dos contigs pueden disponerse de modo correspondiente. En tales casos se insertó una secuencia
- 20 de 100 Ns para rellenar el hueco entre los contigs de secuencia. La información de los TE intercalados (es decir, los TE que se han insertado en otros TE) también se utilizó para ordenar los contigs de secuencia.
4. En algunas regiones no se pudo utilizar ni la información de BAC solapados ni las anotaciones de TE (este fue el caso principalmente en regiones cubiertas por un solo BAC). Allí, los contigs de secuencias se dispusieron al azar y los huecos entre ellos se rellenaron con secuencias de 200 Ns.
- 25 5. Muchos de los TE del genoma del maíz son retrotransposones de repetición terminal larga (LTR, por Long Terminal Repeat) flanqueados por secuencias LTR largas (1-2 kb). Estas LTR pueden ser hasta un 100% idénticas. En algunos casos, las secuencias crudas de los dos LTR se ensamblaron en una secuencia consenso (es decir, una copia del LTR no está presente en el ensamblaje). En estos casos, los huecos de secuencia se rellenaron con el número de N que correspondería a la longitud de la segunda LTR.
- 30 6. Los genes se anotaron manualmente. Para ello, se utilizaron como referencia las secuencias codificantes (CDS) del genoma publicado del maíz B73 (http://www.maizegdb.org/gene_model.php). Las CDS se alinearon con la secuencia RP4HTN mediante DotPlot (<http://www.dotplot.org/>) para determinar las posiciones de exones e intrones. Los genes candidatos se determinaron, por un lado, describiendo su función (si se conocía públicamente). Por otro lado, se comparó la CDS del RP4HTN resistente con la del B73 AGPv02 susceptible.
- 35 Si había diferencias, el gen respectivo se incluía en la lista de candidatos. La secuencia final tiene una longitud de 1'328'253 pb. La lista de genes candidatos se muestra en la Tabla 1.

5. Análisis molecular de los genes candidatos:

Análisis de expresión: La expresión de los diferentes genes candidatos se probó en plantas de 21 días (después de la siembra), no infectadas (día de infección = 0 dpi) así como en plantas de 36 días infectadas y no infectadas con *H. turcicum* (15 días después de la infección = 15 dpi inf/ni).

Se extrajo ARN de la segunda hoja de las plantas de maíz ensayadas, se transcribió inversamente en ADNc y se midió la expresión mediante qPCR. En cada caso, se cosechó la segunda hoja, se congeló y se extrajo el ARN, se cuantificó y se comprobó su calidad y pureza utilizando el kit SV Total RNA Isolation System (Z3100; Promega, Dübendorf, Suiza), como se describe (Brunner *et al.*, 2011; Risk *et al.*, 2012). Se transcribió inversamente 1 µg de ARN con el iScript RT Supermix (170-8841; Bio-Rad, Cressier, Suiza) en un volumen de reacción de 20 µl según las instrucciones del fabricante. Para excluir la posible contaminación por ADN genómico (RT menos), se incubó en paralelo una reacción de cada muestra sin añadir transcriptasa inversa.

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se realizó por triplicado técnico o duplicado en un volumen de reacción de 10 µl y añadiendo 4 µl de ADNc diluido 1:10 (Tris HCL de 1mM, pH 8, EDTA de 0,1 mM), 5 µl de SsoFast EvaGreen® Supermix (172-5201; Bio-Rad, Suiza) y una concentración de cebadores de 400 nM en el C1000 Touch Cycler (Bio-Rad, Suiza). Para la amplificación se utilizó el siguiente programa: 95°C durante 30 segundos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y, a continuación, 60-63°C (según la Tabla 2) durante 5 segundos. Para analizar la curva de fusión (exclusión de dímeros de cebadores), el producto de la PCR se calentó de 65°C a 95°C en pasos de 0,5°C. Las curvas de amplificación y las curvas de fusión se comprobaron en el programa CFX Manager V 3.0 (Bio-Rad, Suiza) y los valores Cq (ciclo de cuantificación) se exportaron al programa qbasePLUS V 2.3 (Biogazelle, Zwijnaarde, Bélgica) para determinar la expresión relativa.

Los cebadores para los genes candidatos se determinaron utilizando Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) con el fin de excluir en la medida de lo posible la amplificación inespecífica en transcritos ya conocidos. Para evaluar los amplicones adecuados, los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se comprobó la existencia de una única banda y su tamaño. Además, se secuenciaron los amplicones según la Tabla 1 de RP1 HTN así como de NILHTN. Se utilizaron 1-3 genes de referencia (LUG, MEP, FPGS) para normalizar los datos de expresión (Manoli *et al.*, 2012).

Todos los genes candidatos se expresan en el genotipo susceptible RP1 y en el genotipo resistente RP1HTN. La expresión diferencial entre RP1 y RP1 HTN se mostró para RLK1. RLK1 se expresa hasta 4 veces más en las plantas susceptibles que en las resistentes.

Tabla 9: Pares de cebadores para los genes candidatos con su longitud de amplicón en pb y la temperatura de hibridación apropiada.

Nombre del gen	Nombre del cebador	SEQ ID NO:	Secuencias de cebadores (F = secuencia directa; R = secuencia inversa)	Longitud (en pb) en RP1	Longitud (en pb) en RP1HTN	Temperatura de hibridación
ZNF1	GH034	229	F: TGGTTGGTGTCTGAAGCTGAG	130	130	60°C
	GH033	230	R: ATTTATCCCGGCCTTTGCAT			
	GH039	231	F: GATCTACAGGGAAGCCCACTGA			
	GH040	232	R: TTTTCCTTGAGGCAGTTATATGCT			
HYD	GH039	231	F: GATCTACAGGGAAGCCCACTGA	74	74	60°C
	GH040	232	R: TTTTCCTTGAGGCAGTTATATGCT			
RLK4	GH220	233	F: TTGTGCAGCGGAGGGAA	91	85	63°C
	GH221	234	R: CCAGGGCACCAGCAAGAAT			
EXT1	GH168	235	F: CGACTACAAGACGCGTACC	103	103	60°C
	GH170	236	R: GGTGTCGATGGTGAGGTTTC			
RLK1	GH138	237	F: TATTGTTGGTGCTGTTGCCG	121	121	60°C
	GH139	238	R: GGACTCAATCCTTGTCCTG			

Nombre del gen	Nombre del cebador	SEQ ID NO:	Secuencias de cebadores (F = secuencia directa; R = secuencia inversa)	Longitud (en pb) en RP1	Longitud (en pb) en RP1HTN	Temperatura de hibridación
RET1	GH055	239	F: CGCTCGTTTGCCAGATAGCC	165	165	60°C
	GH056	240	R: CACGGTGTGTGCCAGTTTGT			

Selección de poblaciones de laboreo y detección de mutantes: para los genes candidatos (Tabla 1) se puede clasificar una población de laboreo de 10000 plantas, portadoras de la introgresión desde Pepitilla al cromosoma 8 en la región de 151688552 - 153139596 pb en comparación con la referencia B73 AGPv02 (www.maizesequence.org) (RP3HTN1) y que muestren resistencia a *Helminthosporium turcicum*. Las mutaciones pueden ser sustituciones silentes de nucleótidos, sustituciones de aminoácidos o codones de parada y sirven para probar la función del gen candidato.

Transformación: Los genes candidatos pueden, por ejemplo, introducirse en el genotipo susceptible A188 mediante transformación proporcionada por *Agrobacterium tumefaciens*. Este genotipo se caracteriza por valores AUDPC de 702 en la prueba GWH (n=18 plantas), de modo que la transformación con el gen de resistencia da lugar a una clara respuesta de resistencia.

6. Determinación de la especificidad de raza; prueba de que HTN1 también proporciona resistencia inespecífica de raza

La selección de genotipos con el gen HtN se lleva a cabo en muchos lugares de todas las regiones infestadas de Europa. Hasta ahora, esta resistencia aún no se ha roto, por lo que suponemos que no es específica por raza hasta que se encuentre una raza N. La raza 1 predomina en Europa, aunque también se han detectado las razas 2 o 3 o una combinación de estas en regiones individuales (Hanekamp *et al.*, 2013).

7. Pruebas fenotípicas de otras plantas recombinantes

Se seleccionaron nuevas plantas recombinantes para la región QTL y se correlacionaron con los datos fenotípicos. La selección incluyó plantas que cubrían diferentes regiones de la región diana. Se identificaron plantas recombinantes que mostraban una introgresión del donante B37HTN1 en el fondo genético de RP1 entre los marcadores MA0005 y MA0021 - región marcadora M7 y los marcadores MA0013 y MA0022 - región marcadora M8. La Figura 4 muestra que esta región solo comprende los tres genes RLK4, EXT1 y RLK1. Estas plantas recombinantes, que comprenden la región M7 - M8, muestran el fenotipo resistente tanto en el campo bajo inoculación artificial como también en la prueba de invernadero.

8. Identificación del gen candidato que proporciona resistencia

Para identificar el gen que proporciona resistencia, se examinó la población de laboreo de 10000 plantas, que lleva la introgresión de Pepitilla al cromosoma 8 en la región de 151688552 - 153139596 pb en comparación con la referencia B73 AGPv02 (<http://www.genome.arizona.edu>) (RP3HTN1) y muestra resistencia frente a *Helminthosporium turcicum*.

Se desarrollaron amplicones para los genes RLK4 y RLK1 (Tabla 10) y se secuenciaron mediante secuenciación Sanger tras la amplificación del ADN de planta única de la población de laboreo.

Tabla 10: Secuencias de cebadores de los amplicones

Nombre de gen	Nombre del cebador	SEQ ID NO:	Secuencias de cebadores (F = secuencia directa; R = secuencia inversa)	Longitud del amplicón (en pb)	Temperatura de hibridación(°C)
RLK4	MA04916-6f	247	F: TGTTTCAG GAATCACG CAACTGGA	399	60

	MA04916-6r	248	R: GCACCACG CCATGACC AACATC		
RLK1	TG10013-10.f	249	F: CTTCCTAC AGAAGAAC GAGAGT	804	60
	TG10013-11.r	250	R: TTCCTCAC GAGCTCTG TGCTC		

Las secuencias de los amplicones se analizaron con el software DNASTAR Lasergene y se identificaron las mutaciones de base. La Tabla 11 enumera una selección de las mutaciones encontradas.

Tabla 11: Mutaciones identificadas para los genes RLK4 y RLK1

Nombre del gen	Nombre de la mutación	Posición de la mutación en el ADNc del RP3HTN1 (pb)	Intercambio de base	Posición de la mutación en la secuencia proteica del RP3HTN1 (pb)	Efecto de cambio de aminoácidos
RLK4	RLK4d	977 en SEQ ID NO: 3	G > A	326 en SEQ ID NO: 4	G > D
	RLK4f	1169 en SEQ ID NO: 3	C > T	390 en SEQ ID NO: 4	T > I
RLK1	RLK1b	1365 en SEQ ID NO: 1	G > A	455 en SEQ ID NO: 2	M > I
	RLK1d	1490 en SEQ ID NO: 1	G > A	497 en SEQ ID NO: 2	G > E

5

Los mutantes identificados se autofecundaron en el invernadero y las semillas de las plantas homocigóticas con alelo de tipo silvestre y alelo de mutación por evento de mutación se cosecharon para una prueba fenotípica.

10 Quince plantas individuales homocigóticas con alelo de tipo silvestre y alelo de mutación de cada uno de los mutantes RLK1b, RLK1d, RLK4d y RLK4f y los controles RP1 y RP1HTN1 se inocularon con *H. turcicum* en el invernadero como se ha descrito anteriormente. La infestación se determinó cada día entre 11 y 25 días después de la inoculación. Los valores de AUDPC de todas las plantas ensayadas se resumen en la Tabla 12. Se espera que el cambio del aminoácido en el progenitor resistente de la población de laboreo RP3HTN1 resulte en una susceptibilidad de los mutantes homocigotos.

15 Tabla 12: Valores AUDPC de las plantas homocigóticas con alelo de tipo silvestre y alelo de mutación de los genes RLK1 y RLK4. En la columna de fenotipo, 0 - 100 significa resistente, 101 - 450 heterocigoto, y > 450 susceptible.

Nombre mutante	Alelos	AUDPC	Fenotipo
RLK4d	Hom. mutante	33,3	Resistente
	Hom. Tipo silvestre	0,0	Resistente
RLK4f	Hom. mutante	46,7	Resistente
	Hom. Tipo silvestre	96,7	Resistente
RLK1b	Hom. mutante	346,7	Heterocigoto
	Hom. Tipo silvestre	46,4	Resistente
RLK1d	Hom. mutante	406,7	Heterocigoto
	Hom. Tipo silvestre	83,3	Resistente
RP1		1030,0	Susceptible

RP1HTN1		0,0	Resistente
---------	--	-----	------------

Referencias

- Bar-Zur, A, Tadmor, Y, Juvik, JA, Shimoni, M, & Reuveni, R (1998). "Resistance to northern leaf blight in maize (*Zea mays*) conditioned by the HtN gene and the association with isoperoxidases." *Canadian Journal of Plant Pathology* 20(1): 28-34.
- Brunner, S., Hurni, S., Herren, G., Kalinina, O., von Burg, S., Zeller, S.L., Schmid, B., Winzeler, M. and Keller, B. (2011) Transgenic Pm3b wheat lines show resistance to powdery mildew in the field. *Plant Biotechnology Journal*, no-no.
- Chevalier, BS, Kortemme, T, Chadsey, MS, Baker, D, Monnat, RJ, Stoddard, BL (2002). «Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease». *Mol. Cell* 10 (4): 895-905. doi:10.1016/S1097-2765(02)00690-1.
- Carson, ML (1995) «A new gene in maize conferring the chlorotic halo reaction to infection by *Exserohilum turcicum*. *Plant Disease* 79: 717-720.
- Chung, C-L, Poland, J, Wisser, R, Kolkman, J, y Nelson, R (2008). «Analysis of qEt8.06, a Major QTL for Resistance to Northern Leaf Blight in Maize» póster, Annual Research Meeting of Generation Challenge Programme, Bangkok, Tailandia.
- http://www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson_r/Docs/01_CLC_08GCP_12Sep08_2.pdf Chung, C-L, Jamann, T, Longfellow, J y Nelson, R (2010). «Characterization and finemapping of a resistance locus for northern leaf blight in maize bin 8.06» *Theoretical and Applied Genetics* 121(2): 205-227.
- Coates, ST y White DG (1998). «Inheritance of resistance to grey leaf spot in crosses involving selected resistant inbred lines of corn». *Phytopathology* 88(9): 972-982.
- Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet.* 1(6): 561-73.
- Ferguson, LM y Carson ML (2007). "Temporal Variation in *Setosphaeria turcica* Between 1974 and 1994 and Origin of Races 1, 23, and 23N in the United States." *Phytopathology* 97: 1501-1511.
- Gevers, HO (1975). "A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight of maize." *Plant Dis Rep* 59: 296-300.
- Gaj, T, Gersbach, CA y Barbas III, CF (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*.
- Ganal MW, Durstewitz G, Polley A, Berard A, Buckler ES, Charcosset A, Clarke JD, Graner E-M, *et al.* (2011) "A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: Development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome." *PLoS ONE* 6 e28334.
- Gianasi, L, de Castro, HA y da Silva, HP (1996). «Raes fisiologicas de *Exserohilum turcicum* identificadas em regiões produtoras de milho no Brasil, Safra 93/94.» *Summa Phytopathol.* 22: 214-217.
- Griffiths, AJF, Miller, JH, Suzuki, DT, Lewontin, RC y Gelbart, WM (2000) *An Introduction to Genetic Analysis*, 7ª edición, Nueva York: W. H. Freeman; ISBN-10: 0-7167-3520-2
- Gupta, PK y Varshney, R (2013) *Cereal Genomics II*, Springer Science+Business Media Dordrecht, Países Bajos; DOI: 10.1007/978-94-007-6401-9_1.
- Hanekamp H., Kessel B., Koopmann B., von Thiedemann A.: Tizón de la hoja del Turcicum en el maíz: determinación de razas y presencia regional de *Exserohilum turcicum* en Europa; 28 de enero de 2013, PG Enfermedades de los Cereales, Ponencia; Tizón de la hoja.
- Jordan, EG, Perkins, JM, Schall, RA y Pedersen, WL (1983). "Occurrence of race 2 of *Exserohilum turcicum* on corn in the central and eastern United States." *Plant Disease* 67: 1163-1165.
- Li, T., Huang, S., Jiang, W. Z., Wright, D., Spalding, M. H., Weeks, D. P., & Yang, B. (2011). TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic acids research*, 39(1), 359-372.

- Lipps, PE, y Hite, RE (1982). "Exserohilum turcicum virulent on corn with the Ht resistance gene in Ohio." Plant Disease 66: 397-398.
- Lipps, PE, Pratt, RA y Hakiza, JJ (1997). "Interaction of Ht and partial resistance to Exserohilum turcicum in maize." Plant Disease 81: 277-282.
- 5 Maniatis, T, Fritsch, EF, Sambrook, J (1982) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Manoli A., Sturaro A., Trevisan S., Quaggiotti S., Nonis A. (2012) Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize, Journal of Plant Physiology, Volumen 169, número 8, mayo 15 de 2012, páginas 807-815.
- 10 Margulies, M, Egholm, M, Altman, WE, Attiya, S, Bader, JS, Bemben, LA *et al.* y Volkmer, GA (2005) "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." Nature, 437(7057), 376-380.
- Moghaddam, FP y Pataky, JK (1994). "Reactions for isolates from mating of races 1 and 23N of Exserohilum turcicum." Plant Disease 78: 767-771.
- Min, J, Chunyu, Z, Khalid, H, Nan, L., Quan, S, Qing, M, Suwen, W y Feng, L (2012). "Pyramiding resistance genes to Northern Leaf Blight and Head Smut in maize." Int. J. Agric. Biol. 14(3): 430-434.
- 15 Odell JT, Nagy F, Chua N-H (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313, 810 - 812
- Pataky, JK, Raid, RN, du Toit, LJ y Schueneman, TJ (1998). "Disease severity and yield of sweet corn hybrids with resistance to Northern Leaf Blight." Plant Disease 82(1): 57-63.
- 20 Perkins, JM y Pedersen, WL (1987). "Disease development and yield losses associated with northern leaf blight on corn." Plant Disease 71: 940-943.
- Pratt, R y Gordon, S (2006). "Breeding for resistance to maize foliar pathogens." Plant Breed Rev. 27: 119-173.
- Puchta, H y Hohn, B (2010). Breaking news: Plants mutate right on target. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(26), 11657-11658.
- 25 Raymundo, AD y Hooker, AL (1981a). "Measuring the relationship between northern corn leaf blight and yield losses." Plant Disease 65: 325-327.
- Raymundo, AD, Hooker, AL y Perkins, JM (1981b). "Effect of Gene HtN on the Development of Northern Corn Leaf Blight Epidemics." Plant Disease 65(4): 327-329.
- 30 Risk, J.M., Selter, L.L., Krattinger, S.G., Viccars, L.A., Richardson, T.M., Buesing, G., Herren, G., Lagudah, E.S. y Keller, B. (2012) Functional variability of the Lr34 durable resistance gene in transgenic wheat. Plant Biotechnology Journal, 10, 477-487.
- Rozen, S y Skaletsky, HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
- 35 Rushton, PJ, Torres, JT, Parniske, M, Wernert, P, Hahlbrock, K y Somssich, IE (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. EMBO J. 15(20): 5690-5700.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3a ed. 2001. Sanger, F y Coulson, AR. (1975) J. Molec. Biol. 94, 414-418.
- 40 Silva, G, Poirot, L, Galetto, R, Smith, J, Montoya, G, Duchateau, P, & Pâques, F (2011) Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. Current gene therapy, 17(1), 11.
- Simcox, KD, y Bennetzen, JL (1993). "The use of molecular markers to study Setosphaeria turcica resistance in maize." Phytopathology 83: 1326-1330.
- 45 Shimoni, M, Bar-Zur, A, & Reuveni, R (1991). The association of peroxidase activity and resistance of maize to Exserohilum turcicum. Journal of phytopathology, 131(4), 315-321.

- Stankovic, S, Levic, J, & Ivanović, D (2007). Genetic variability of maize pathogens in Serbia. *Genetika*, 39(2), 227-240.
- Thakur, RP, Leonard, KJ y Leath, S (1989). "Effects of temperature and light on virulence of *Exserohilum turcicum* on corn." *Phytopathology* 1989, 79: 631-635.
- 5 Tzfira, T, Weinthal, D, Marton, I, Zeevi, V, Zuker, A, & Vainstein, A (2012). Genome modifications in plant cells by custom-made restriction enzymes. *Plant biotechnology journal*, 10(4), 373-389.
- Ullstrup, AJ y Miles, SR (1957). "The effects of some leaf blights on corn grain yield." *Phytopathology* 47:331-336.
- Walsh *et al.* (2008), presentación de póster P192, 50ª Conferencia de Genética del Maíz en Washington D.C.
- 10 Welz, HG (1998). "Genetics and epidemiology of the pathosystem *Zea mays*/Setosphaeria turcica." Tesis de Habilitación Instituto de Cultivo de Plantas, Investigación de Semillas y Genética de Poblaciones, Universidad de Hohenheim.
- Welz, HG y Geiger, HH (2000). "Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations." *Plant Breeding* 119: 1-14.
- 15 WO/2000/29592 (Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.). Chimeric promoters capable of mediating gene expression in plants upon pathogen infection and uses thereof.
- WO/2007/147395 (KWS SAAT AG). Promotor sintético inducible por patógenos.
- WO/2010/079430 (Bonas *et al.*) Modular DNA-binding domains and methods of use
- WO/2011/072246 (Regents of the University of Minnesota) TAL effector-mediated DNA modification.
- 20 WO/2011/163590 (Du Pont) Compositions and methods for enhancing resistance to Northern Leaf Blight in maize.

REIVINDICACIONES

1. Planta de maíz, en cuyo genoma está integrado un fragmento cromosómico del donante Pepitilla en el cromosoma 8 bin 5 o bin 6, y el fragmento cromosómico comprende un intervalo del donante que muestra al menos el alelo donante del marcador MA0008 y tiene un polinucleótido que proporciona resistencia frente a *Helminthosporium turcicum* en la planta de maíz, y en el que el fragmento cromosómico no contiene
 - a) un intervalo del donante entre el marcador SYN14136 y el marcador SYN24931 y/o
 - b) un intervalo del donante entre el marcador PZE-108093748 y el marcador MA0004, y/o
 - c) un intervalo del donante entre el marcador PZE-108097482 y el marcador PZE-108107671 en cuyo caso el polinucleótido comprende una molécula de ácido nucleico que tiene
- 5 (i) una secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1, o
 - (ii) una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos según la SEQ ID NO: 1, o
 - (iii) que se hibrida con la cadena complementaria de una molécula de ácido nucleico según (i) o (ii) en condiciones estrictas, o
- 10 (iv) que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, o
 - (v) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 90% a una de las secuencias de aminoácidos según (iv),
 y el alelo donante del marcador MA0008 en la posición 152045141 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 muestra una timina;
- 20 el marcador SYN14136 en la posición 131681497 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 es detectable mediante cebadores de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 17-19, el marcador SYN24931 en la posición 131905855 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 es detectable mediante cebadores de acuerdo con una de las SEQ ID NO: 23-25,
- 25 el marcador PZE-108093748 en la posición 150562764 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 es detectable mediante cebadores de acuerdo con una de las SEQ ID NOs: 32-34,
- el marcador MA0004 en la posición 151688652 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 es detectable mediante cebadores de acuerdo con una de las SEQ ID NOs: 41-43,
- el marcador PZE-108097482 en la posición 153139646 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 es detectable mediante cebadores de acuerdo con uno de los SEQ ID NOs: 50-52, y
- 30 el marcador PZE-108107671 en la posición 161543406 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 es detectable mediante cebadores según una de las SEQ ID NO: 35-37.
2. Planta de maíz según la reivindicación 1, en la que el fragmento cromosómico no contiene además un intervalo del donante entre el marcador PZE-108077560 y el marcador PZE-108093423,
- 35 en cuyo caso el marcador PZE-108077560 es detectable en la posición 133189880 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según una de las SEQ ID NOs: 26-28, y
- el marcador PZE-108093423 es detectable en la posición 150279048 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores de acuerdo con una de las SEQ ID NOs: 29-31.
3. Planta de maíz según la reivindicación 1, en la que el tiempo de floración de la planta de maíz y/o el rendimiento de ensilado de la planta de maíz corresponde al de una planta de maíz de comparación en cuyo genoma no está integrado el fragmento cromosómico de la Pepitilla donante.
- 40 4. Planta de maíz según una de las reivindicaciones anteriores, en la que la resistencia frente a *Helminthosporium turcicum* es inespecífica de raza.
5. Planta de maíz según una de las reivindicaciones precedentes, en la que el rendimiento no se reduce por la integración del fragmento cromosómico.
- 45 6. Planta de maíz según la reivindicación 5, en la que el rendimiento es el rendimiento de ensilado.

7. Célula, tejido o parte de la planta de maíz según una de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Grano o semilla de la planta de maíz según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que un fragmento cromosómico del donante Pepitilla está integrado en el genoma del grano o semilla en el cromosoma 8 bin 5 o bin 6, y el fragmento cromosómico comprende un intervalo del donante que muestra al menos el alelo donante del marcador MA0008 y tiene un polinucleótido que proporciona resistencia frente a *Helminthosporium turcicum* en la planta de maíz, y el fragmento cromosómico no contiene
- 5 a) un intervalo del donante entre el marcador SYN14136 y el marcador SYN24931 y/o
- b) un intervalo del donante entre el marcador PZE-108093748 y el marcador MA0004, y/o
- 10 c) un intervalo del donante entre el marcador PZE-108097482 y el marcador PZE-108107671 en cuyo caso el polinucleótido comprende una molécula de ácido nucleico
- (i) que tiene una secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1 o
- (ii) que tiene una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos según la SEQ ID NO: 1 o
- 15 (iii) que hibrida con la cadena complementaria de una molécula de ácido nucleico según (i) o (ii) en condiciones estrictas o
- (iv) que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 o
- (v) que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 90% a una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con (iv)
- 20 y el alelo donante del marcador MA0008 en la posición 152045141 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 muestra una timina,
- el marcador SYN14136 es detectable en la posición 131681497 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 17-19,
- el marcador SYN24931 es detectable en la posición 131905855 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 23-25,
- 25 el marcador PZE-108093748 es detectable en la posición 150562764 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 32-34,
- el marcador MA0004 es detectable en la posición 151688652 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 41-43,
- 30 el marcador PZE-108097482 es detectable en la posición 153139646 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 50-52, y
- el marcador PZE-108107671 es detectable en la posición 161543406 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 35-37.
9. Célula de una planta de maíz, en cuyo genoma está integrado un fragmento cromosómico del donante Pepitilla en el cromosoma 8 bin 5 o bin 6, y el fragmento cromosómico comprende un intervalo del donante que muestra al menos el alelo donante del marcador MA0008 y tiene un polinucleótido que proporciona resistencia frente a *Helminthosporium turcicum* en la planta de maíz, y el fragmento cromosómico no contiene
- 35 a) un intervalo del donante entre el marcador SYN14136 y el marcador SYN24931 y/o
- b) un intervalo del donante entre el marcador PZE-108093748 y el marcador MA0004, y/o
- 40 c) un intervalo del donante entre el marcador PZE-108097482 y el marcador PZE-108107671 en cuyo caso el polinucleótido comprende una molécula de ácido nucleico
- (i) que tiene una secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1 o
- (ii) que tiene una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos según la SEQ ID NO: 1 o

- (iii) que hibrida con la cadena complementaria de una molécula de ácido nucleico según (i) o (ii) en condiciones estrictas o
- (iv) que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 o
- 5 (v) que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 90% a una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con (iv)
- y el alelo donante del marcador MA0008 en la posición 152045141 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 muestra una timina,
- el marcador SYN14136 es detectable en la posición 131681497 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 17-19,
- 10 el marcador SYN24931 es detectable en la posición 131905855 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 23-25,
- el marcador PZE-108093748 es detectable en la posición 150562764 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 32-34,
- 15 el marcador MA0004 es detectable en la posición 151688652 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 41-43,
- el marcador PZE-108097482 es detectable en la posición 153139646 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 50-52, y
- el marcador PZE-108107671 es detectable en la posición 161543406 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 35-37.
- 20 10. Procedimiento para producir una planta de maíz según una de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las siguientes pasos:
- (A) transformar transitoriamente una célula de planta de maíz con una primera secuencia de nucleótidos que codifica una primera proteína con actividad de endonucleasa capaz de inducir una rotura bicatenaria de ADN en el genoma de la célula de planta de maíz entre el marcador SYN24931 y el marcador MA0005, y con una
- 25 segunda secuencia de nucleótidos que codifica una segunda proteína con actividad de endonucleasa capaz de inducir una rotura bicatenaria del ADN en el genoma de la célula vegetal de maíz entre el marcador MA0006 y el marcador SYN4196,
- (B) introducir transitoriamente en la primera célula de planta de maíz un vector donante portador de un fragmento cromosómico de la Pepitilla donante, en cuyo caso el fragmento cromosómico comprende un
- 30 intervalo del donante que evidencia el alelo donante del marcador MA0008 y tiene un polinucleótido que proporciona resistencia frente a *Helminthosporium turcicum* en la planta de maíz, y el fragmento cromosómico comprende además los segmentos cromosómicos de la Pepitilla donante entre los sitios de las roturas bicatenarias de (A), de modo que tiene lugar una recombinación homóloga entre el genoma de la primera célula de la planta de maíz y el fragmento cromosómico del vector donante,
- 35 (C) regeneración de una planta de maíz a partir de la célula vegetal de maíz,
- (D) identificación de una planta de maíz según la invención;
- en cuyo caso el alelo donante del marcador MA0008 en la posición 152045141 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 muestra una timina, y
- 40 el marcador SYN24931 es detectable en la posición 131905855 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 23-25,
- el marcador MA0005 es detectable en la posición 151831049 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 44-46,
- el marcador MA0006 es detectable en la posición 152888310 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 47-49, y
- 45 el marcador SYN4196 es detectable en la posición 161766769 con respecto al genoma de referencia B73 AGPv02 mediante cebadores según las SEQ ID NOs: 38-40.

Figura 1

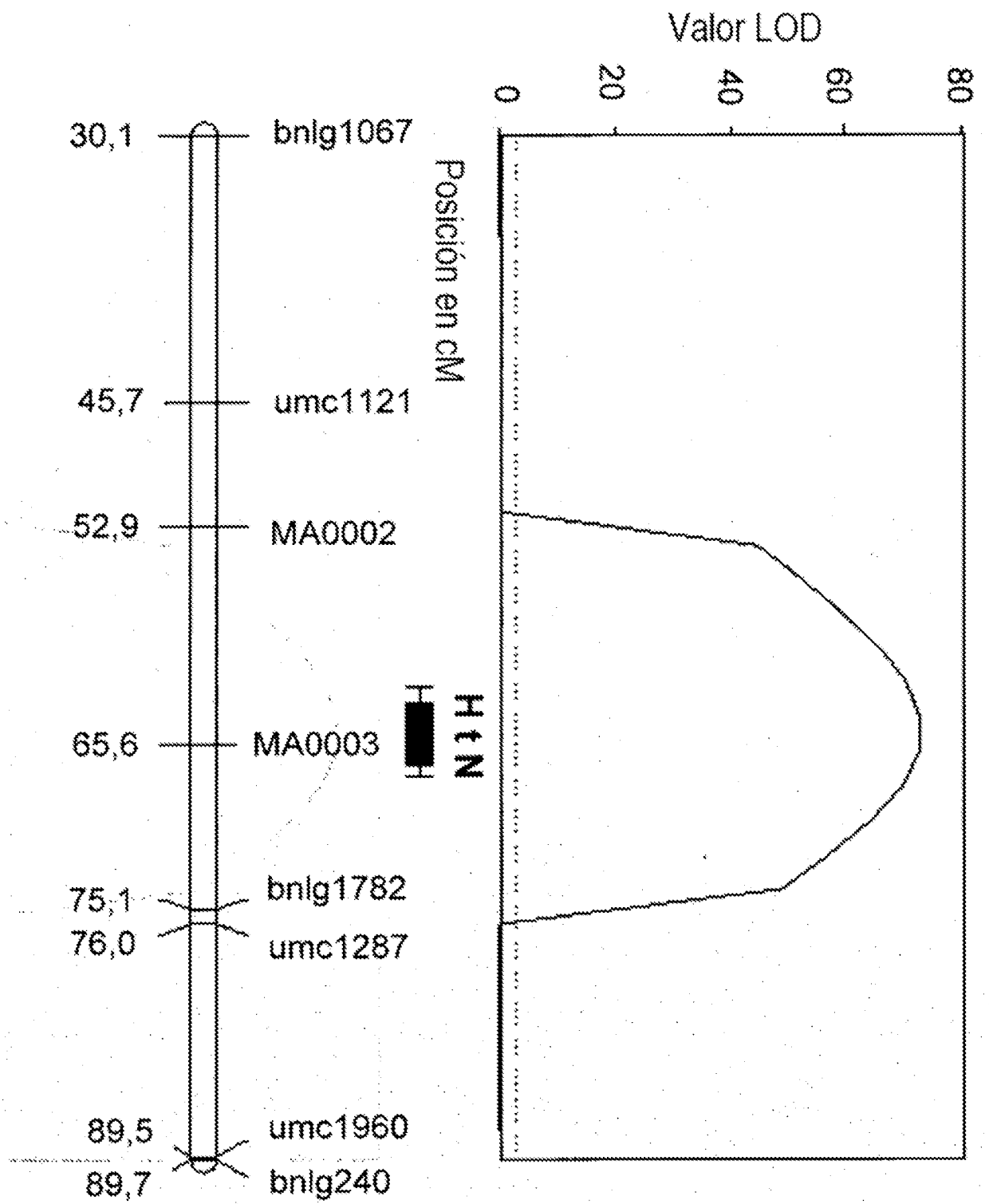


Figura 2

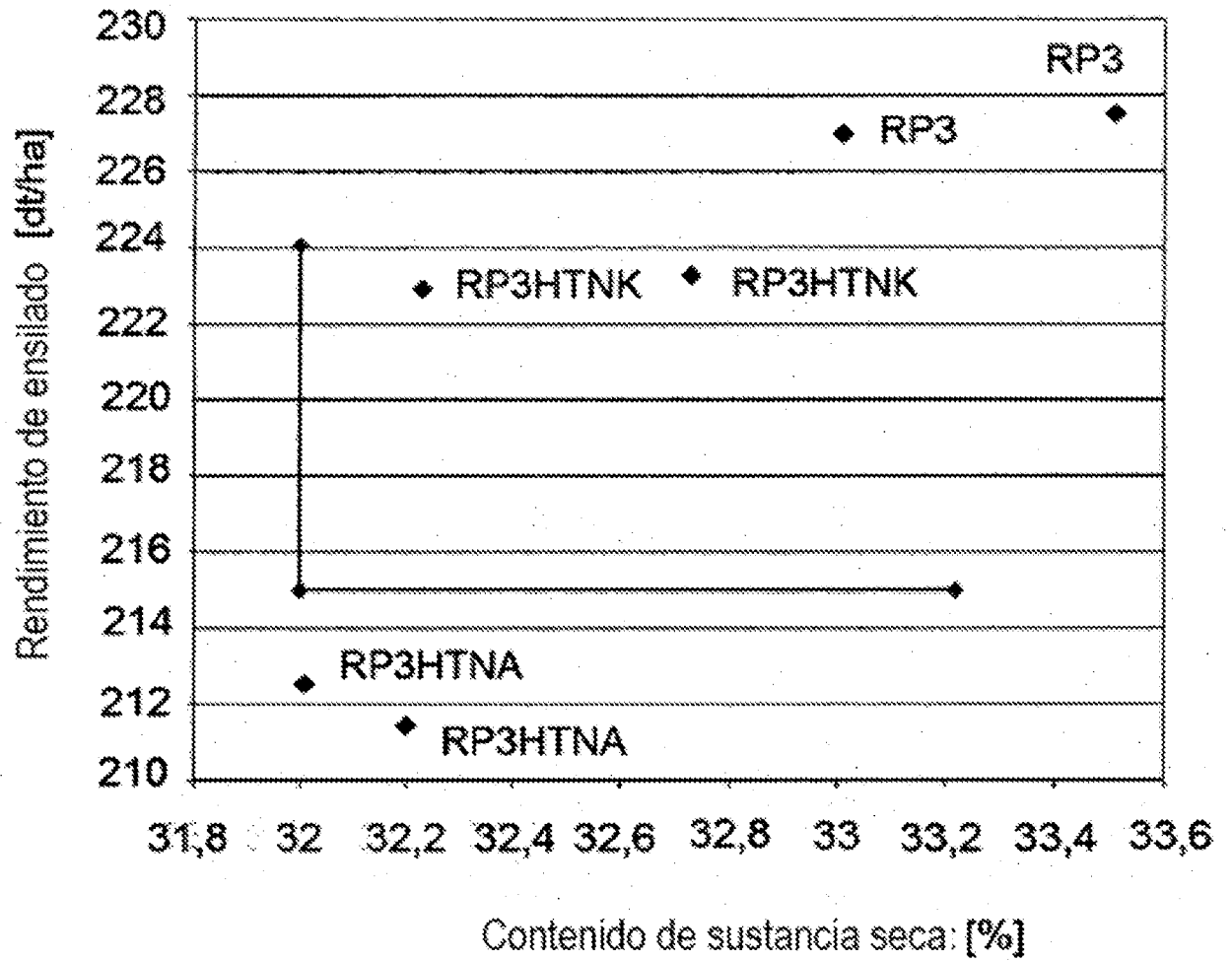


Figura 3

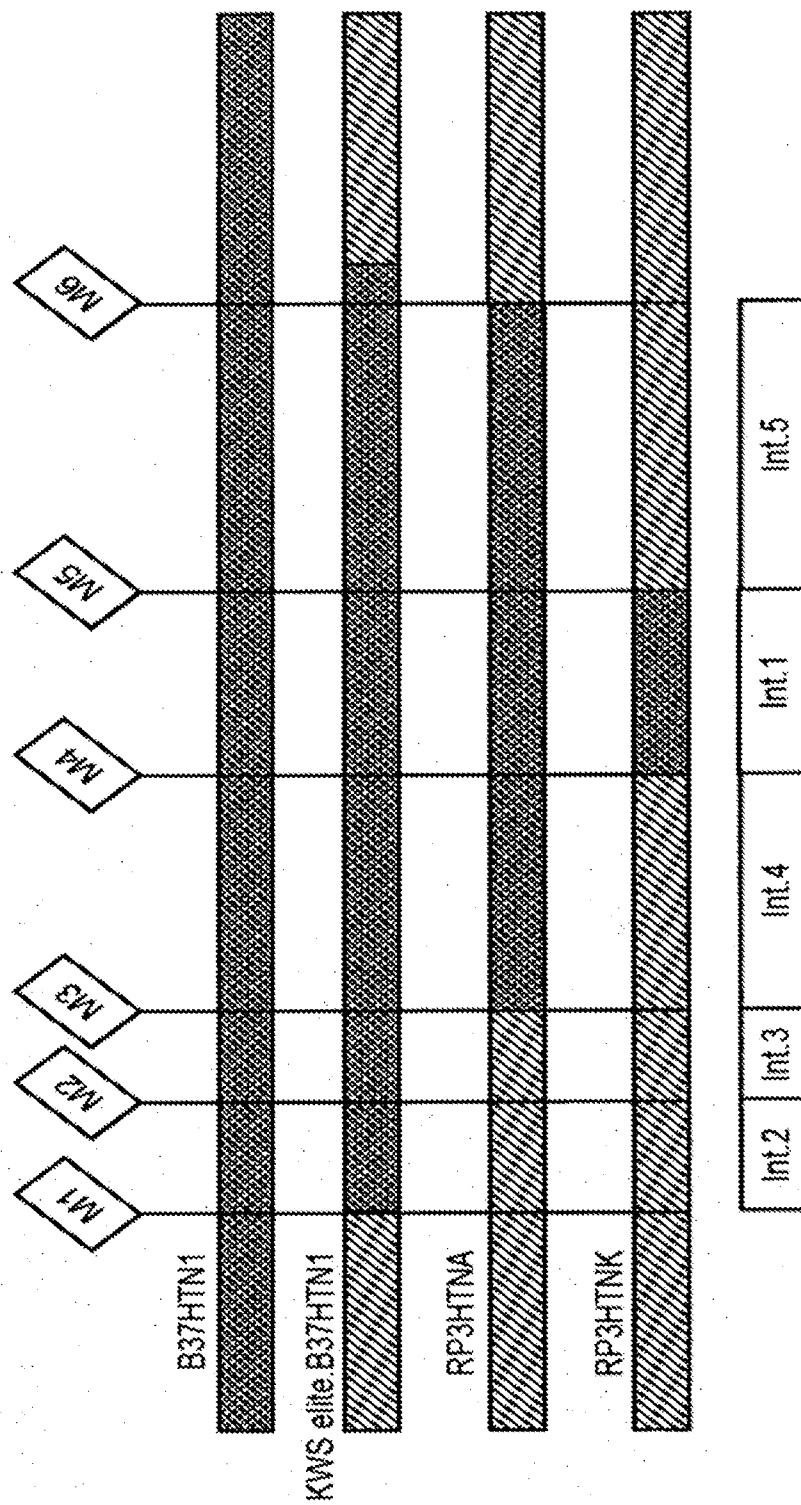


Figura 4

