

AUMENTO DE LA TRANSFORMABILIDAD E INDUCCIÓN DE HAPLOIDÍA EN PLANTAS

CAMPO

La presente divulgación se refiere al campo de la
5 biotecnología vegetal. En particular, se refiere a la
transformación de plantas y el fitomejoramiento, así como a
la edición génica, incluso en plantas resistentes a aceptar
transgenes extraños.

REFERENCIA A UNA LISTA DE SECUENCIAS PRESENTADA COMO UN 10 ARCHIVO DE TEXTO A TRAVÉS DE EFS-WEB

La copia oficial del listado de secuencias se presenta
electrónicamente por EFS-Web como listado de secuencias en
formato ASCII con un archivo denominado 82222_ST25.txt,
creado el 25 de marzo de 2022, y que tiene un tamaño de
15 231 KB y se presenta simultáneamente con la memoria
descriptiva. El listado de secuencias contenido en este
documento en formato ASCII forma parte de la memoria
descriptiva y se incorpora en el presente documento por
referencia en su totalidad.

20 ANTECEDENTES

La transformación de las plantas, es decir, la
integración estable de ADN extraño ("transgenes") en el
genoma de una planta, se ha usado durante décadas para añadir
rasgos nuevos y útiles a los cultivos. Aunque algunas líneas
25 de maíz son relativamente fáciles de transformar (es decir,

aceptación del ADN transgénico), la mayoría de las líneas no lo son. Por ejemplo, la mayoría de líneas endogámicas de élite, que se producen por autopolinización durante varias generaciones para obtener un genoma homocigoto puro o casi puro y que se usaron como líneas precursoras para crear híbridos comercialmente valiosos, a menudo no se pueden transformar con ADN extraño. Por lo tanto, para desplazar un rasgo transgénico hacia una línea endogámica, el rasgo transgénico debe transformarse en primer lugar en una línea de maíz transformable. Esta línea de maíz transformada es pocas veces adecuada para su uso como línea precursora en plataformas de mejoramiento. Por lo tanto, la línea de maíz transformada se cruza formando una línea endogámica para crear una planta de progenie que comprenderá, de manera heterocigótica, los genomas del progenitor endogámico y del progenitor transformado. A continuación, esta planta de progenie que comprende el transgén debe retrocruzarse en la línea endogámica durante aproximadamente seis o siete generaciones para eliminar, tanto como sea posible, el genoma al que ha contribuido el progenitor transformado conservando a la vez el rasgo transgénico. Este proceso de introgresión de rasgos generalmente tarda entre tres y siete años.

Se sabe que el maíz tiene al menos cinco citotipos diferentes (clasificados según el genoma mitocondrial): normal A ("NA"), normal B ("NB"), C citoplasmático masculino

estéril ("CMS-C" o "C"), S citoplasmático masculino estéril ("CMS-S" o "S") y T citoplasmático masculino estéril ("CMS-T" o "T"). Pueden descubrirse aún otros citotipos. Las mitocondrias y los cloroplastos presentes en estos diversos citotipos, por medio de su genoma, pueden tener un efecto sobredimensionado, comparativamente hablando, en el fenotipo de una célula vegetal. Estos efectos recién ahora se están determinando. Por ejemplo, recientemente se descubrió que existía una relación entre la transformabilidad (o capacidad de transformación) y el citotipo. Las líneas de maíz que se sabe que son transformables, tienen el citotipo NA, mientras que las líneas de maíz que se sabe que no son transformables (resistentes), tienen el citotipo NB.

Otra herramienta importante en el fitomejoramiento es la inducción de haploidía ("HI", del inglés *haploid induction*), que es una clase de fenómeno de las plantas caracterizado por la pérdida del conjunto de cromosomas de un progenitor (los cromosomas del progenitor inductor de haploidía) del embrión en algún momento durante o después de la fecundación, frecuentemente durante el desarrollo temprano del embrión. Se ha observado inducción de haploidía en numerosas especies vegetales, tales como sorgo, cebada, trigo, maíz, *Arabidopsis*, y muchas otras especies. En el maíz, los embriones o las semillas haploides se pueden producir realizando cruces entre un macho inductor de haploidía (es

decir, "polen inductor de haploidía") y virtualmente cualquier espiga que se seleccione. En el caso de los sistemas HI maternos, por ejemplo, sistemas basados en el linaje matrilineal, los haploides se producen cuando el ADN del polen inductor de haploidía no se transmite totalmente y/o se mantiene a lo largo de las primeras divisiones celulares de los embriones. Los granos resultantes tienen embriones haploides que contienen solo el ADN materno más el endospermo triploide normal (fertilizado). En el caso de sistemas HI paternos, por ejemplo, sistemas basados en IG1 o basados en CENH3, los haploides se producen después de que el espermatozoide fertiliza el óvulo y los cromosomas maternos se pierden con la división celular. Los granos resultantes tienen embriones haploides que contienen solo el ADN paterno más el endospermo triploide normal (fertilizado). Independientemente del sistema HI usado, el fenotipo resultante no es completamente penetrante, conteniendo algunos óvulos embriones haploides y conteniendo otros embriones diploides, embriones aneuploides, embriones quiméricos o embriones abortados. Normalmente, después de la inducción de haploidía, las semillas o los embriones haploides se segregan de sus hermanos diploides y aneuploides usando un cribado con un marcador genético o fenotípico y se desarrollan o cultivan para obtener plantas haploides. Estas plantas se convierten entonces ya sea naturalmente o mediante

manipulación química (por ejemplo, usando un agente antimicrotúbulos tal como colchicina) en plantas de dobles haploides ("DH") que a continuación producen una semilla endogámica.

5 La producción de plantas DH permite a los cultivadores de plantas obtener líneas endogámicas sin tener que practicar una endogamia multigeneracional, con lo que se reduce de este modo el tiempo requerido para producir plantas homocigotas. Las plantas DH representan una herramienta muy valiosa para
10 los cultivadores de plantas, particularmente para generar líneas endogámicas, mapeado de locus de rasgo cuantitativo (QTL, del inglés *quantitative trait locus*), conversión citoplasmática, introgresión de rasgos y cribado de F2 para la mejora de rasgos de alto rendimiento. Se ahorra una gran
15 cantidad de tiempo, ya que las líneas homocigotas se generan esencialmente en una generación, anulando la necesidad de descendencia de una única semilla multigeneracional (endogamia convencional). En particular, debido a que las plantas DH son totalmente homocigotas, son muy adecuadas para
20 realizar estudios genéticos cuantitativos. La producción de una semilla haploide es crítica para el proceso de mejoramiento de dobles haploides.

BREVE SUMARIO

25 La transformación de plantas es un desafío, particularmente en el maíz. Pocas líneas vegetales son

transformables de forma natural; la gran mayoría no lo son. Además, las líneas inductoras de haploidía son difíciles de reproducir, ya que tienen características reproductivas extrañas (por ejemplo, autodelección de ADN durante la reproducción). En el presente documento se proporcionan plantas de maíz sumamente transformables, denominadas "plantas HI-NA", y métodos para su producción y uso. Una planta HI-NA, como se desvela en el presente documento, es homocigota para un alelo mutante de pérdida de función en el gen de la fosfolipasa A2 α de tipo patatina (que también se denomina en diversas publicaciones *MATRILINEAL* [MATL], *NOT LIKE DAD* [NLD] y *PHOSPHOLIPASE A1* [PLA1] y se indica por el ID del gen B73_v4 del maíz GRMZM2G471240) y es al menos heterocigota para uno o más alelos de los QTL y/o genes que son responsables de un aumento de la inducción de haploidía en las plantas. Por ejemplo, la planta HI-NA puede ser homocigota para un alelo mutante de pérdida de función *matl* y al menos heterocigota para un alelo HI en el *qhir8* QTL. Además, la planta HI-NA tiene un acervo de citotipo A normal ("NA"), lo que la hace sumamente transformable. Las plantas HI-NA proporcionadas en el presente documento tienen una notable capacidad de inducción de haploidía (con una tasa de inducción de haploidía de al menos el 12 %, al menos el 15 % o al menos el 18 %) y una transformabilidad superior (una tasa de transformación de al menos el 2 %, al menos el 5 %, 5 10 15 20 25

al menos el 8 %, al menos el 10 %, al menos el 12 % o al menos el 15 %). Las líneas HI-NA se pueden producir a partir de plantas de una variedad de grupos heteróticos (definidos más adelante).

5 Estas plantas HI-NA sumamente transformables pueden transformarse con maquinaria de edición génica para editar el ADN genómico de las líneas vegetales de interés para mejorar los rasgos de las plantas. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N.º 10,285,348 y
10 10,519,456, cada una de las cuales se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad. Al proporcionar plantas HI-NA fácilmente transformables que son fuertes inductores de haploidía y sumamente transformables, la presente divulgación proporciona herramientas útiles para
15 editar de manera eficiente y rentable genomas de cultivos para producir líneas vegetales con los rasgos deseados.

 En un aspecto, el presente documento proporciona una planta de maíz homocigota para una mutación de pérdida de función en el gen de la fosfolipasa A2 α de tipo patatina
20 (MATL) y al menos heterocigota para un alelo HI en al menos un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con un aumento de la inducción de haploidía (HI-QTL), en donde la planta de maíz tiene un citotipo A normal ("NA"). En algunas realizaciones, la planta de maíz es homocigota para el alelo
25 HI en el al menos un HI-QTL. En algunas realizaciones, la

planta de maíz es al menos heterocigota para un alelo TF en al menos un QTL asociado con un aumento de la frecuencia de transformación (TF-QTL). En algunas realizaciones, la planta de maíz es capaz de expresar una enzima de modificación de ADN y, opcionalmente, al menos un ácido nucleico guía.

En otro aspecto, el presente documento proporciona una planta de maíz que es al menos heterocigota para un alelo TF en al menos un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con un aumento de la frecuencia de transformación (TF-QTL). En algunas realizaciones, la planta de maíz es homocigota para un alelo TF en al menos un QTL asociado con un aumento de la frecuencia de transformación (TF-QTL).

En otro aspecto, el presente documento proporciona un método para producir una planta de maíz inductora de haploidía transformable, que comprende: a) proporcionar polen de una primera planta de maíz, en donde la primera planta de maíz es una línea vegetal inductora de haploidía que es homocigota para una mutación de pérdida de función en el gen de la fosfolipasa A2 α de tipo patatina (MATL), al menos heterocigota para un alelo HI en un segundo locus y resistente a la transformación; b) proporcionar una segunda planta de maíz, en donde la segunda planta de maíz comprende el citoplasma A normal ("NA") y, opcionalmente, en donde la segunda planta de maíz es al menos heterocigota para un alelo TF en un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con un

aumento de la frecuencia de transformación (TF-QTL); c) polinizar la segunda planta de maíz con el polen de la primera planta de maíz y obtener al menos una planta de progenie diploide a partir de la misma; d) autopolinizar la
5 al menos una planta de progenie diploide y/o retrocruzar la al menos una planta de progenie diploide con la primera planta de maíz o la segunda planta de maíz durante al menos una generación; y e) seleccionar la progenie del cruce de la etapa d, en donde la progenie seleccionada comprende el
10 citotipo NA, es homocigota para la mutación de pérdida de función en el gen MATL, es al menos heterocigota para el alelo HI en el segundo locus y, opcionalmente, es al menos heterocigota para el alelo TF en el TF-QTL.

En otro aspecto, el presente documento proporciona un
15 método para producir una planta de maíz inductora de haploidía transformable, que comprende: a) proporcionar polen de una primera planta de maíz, en donde la primera planta de maíz es una línea vegetal inductora de haploidía que es homocigota para una mutación de pérdida de función en el gen
20 de la fosfolipasa A2 α de tipo patatina (MATL), al menos heterocigota para un alelo HI en un segundo locus y resistente a la transformación; b) proporcionar una segunda planta de maíz, en donde la segunda planta de maíz es al menos heterocigota para un alelo TF en un locus de rasgo
25 cuantitativo (QTL) asociado con un aumento de la frecuencia

de transformación (TF-QTL); c) polinizar la segunda planta de
maíz con el polen de la primera planta de maíz y obtener al
menos una planta de progenie diploide a partir de la misma;
d) autopolinizar la al menos una planta de progenie diploide
5 y/o retrocruzar la al menos una planta de progenie diploide
con la primera planta de maíz o la segunda planta de maíz
durante al menos una generación; y e) seleccionar la progenie
del cruce de la etapa d, en donde la progenie seleccionada es
homocigota para la mutación de pérdida de función en el gen
10 MATL, es al menos heterocigota para el alelo HI en el segundo
locus y es al menos heterocigota para el alelo TF en el TF-
QTL.

En otro aspecto, el presente documento proporciona un
método para producir una planta de maíz inductora de
15 haploidía transformable, que comprende: a) proporcionar polen
de una primera planta de maíz, en donde la primera planta de
maíz es homocigota para un alelo de tipo silvestre del gen de
la fosfolipasa A2 α de tipo patatina (MATL) y homocigota para
un alelo de tipo silvestre del gen de la proteína de membrana
20 7 (DMP, del inglés *domain membrane protein*) del dominio
DUF679; b) proporcionar una segunda planta de maíz, en donde
la segunda planta de maíz comprende el citoplasma A normal
("NA") y, opcionalmente, en donde la segunda planta de maíz
es al menos heterocigota para un alelo TF en un locus de
25 rasgo cuantitativo (QTL) asociado con un aumento de la

frecuencia de transformación (TF-QTL); c) polinizar la segunda planta de maíz con el polen de la primera planta de maíz y obtener al menos una planta de progenie diploide a partir de la misma; d) autopolinizar la al menos una planta de progenie diploide y/o retrocruzar la al menos una planta de progenie diploide con la primera planta de maíz o la segunda planta de maíz durante al menos una generación; e) seleccionar la progenie del cruce de la etapa d, en donde la progenie seleccionada comprende el citotipo NA y, opcionalmente, es al menos heterocigota para el alelo TF en el TF-QTL; y f) editar al menos una planta de progenie para provocar una mutación de pérdida de función en el gen MATL de tipo silvestre y/o el gen DMP, obteniendo así una planta de maíz inductora de haploidía transformable.

En otro aspecto, el presente documento proporciona un método para editar ADN genómico vegetal, que comprende: a) proporcionar una planta diana, en donde la planta diana comprende el ADN genómico vegetal que se va a editar; b) polinizar la planta diana con polen de una planta de maíz descrita en el presente documento, en donde la planta de maíz es capaz de expresar una enzima de modificación de ADN y, opcionalmente, al menos un ácido nucleico guía; y c) seleccionar al menos una progenie haploide producida por la etapa c, en donde la progenie haploide comprende el genoma de la planta diana y no comprende el genoma de la planta de

maíz, y el genoma de la progenie haploide se ha modificado por la enzima de modificación de ADN y ácido nucleico guía opcional suministrado por la planta de maíz.

En algunas realizaciones, el HI-QTL de cualquiera de los aspectos anteriores es *qhir8* en el cromosoma 9 (HI-QTL *qhir8*). En algunas realizaciones, el alelo HI en el HI-QTL *qhir8* de cualquiera de los aspectos anteriores comprende una mutación de pérdida de función en el gen de la proteína de membrana 7 (DMP) del dominio DUF679. En algunas realizaciones, el TF-QTL de cualquiera de los aspectos anteriores es qCYTO-A_TF3.1 en el cromosoma 3 (TF-QTL qCYTO-A_TF3.1).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** muestra etapas de ejemplo de un proceso de generación de plantas HI-NA de acuerdo con aspectos de esta divulgación.

La **figura 2** muestra un diagrama de los elementos genéticos en la construcción 26258.

La **figura 3** muestra un diagrama de los elementos genéticos en la construcción 24288.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO	Nombre
1	SM7246 cebador D
2	SM7246 cebador I
3	SM7246 FAM

5

10

15

20

25

4	SM7246 TET
5	SM7246 WT
6	SM7246 variante
7	SM7252 cebador D
8	SM7252 cebador I
9	SM7252 FAM
10	SM7252 TET
11	SM7252 WT
12	SM7252 variante
13	Ensayo 2826 TREM26 cebador D
14	Ensayo 2826 PM0033 cebador D
15	Ensayo 2826 TREM26 cebador I
16	Ensayo 2826 PM0033 cebador I
17	Ensayo 2826 FAM
18	Ensayo 2826 TET
19	Ensayo 2827 TREM27 cebador D
20	Ensayo 2827 TREM27 cebador I
21	Ensayo 2827 FAM
22	SM4849 cebador D
23	SM4849 cebador I
24	SM4849 FAM
25	SM4849 TET
26	SM4849 WT
27	SM4849 variante

5

10

15

20

25

28	SM8047 cebador D
29	SM8047 cebador I
30	SM8047 FAM
31	SM8047 TET
32	SM8047 WT
33	SM8047 variante
34	SM8133 cebador D
35	SM8133 cebador I
36	SM8133 FAM
37	SM8133 TET
38	SM8133 WT
39	SM8133 variante
40	SM8029 cebador D
41	SM8029 cebador I
42	SM8029 FAM
43	SM8029 TET
44	SM8029 WT
45	SM8029 variante
46	SM4257 cebador D
47	SM4257 cebador I
48	SM4257 FAM
49	SM4257 TET
50	SM4257 WT
51	SM4257 variante

5

10

15

20

25

52	SM0956BQ cebador D
53	SM0956BQ cebador I
54	SM0956BQ FAM
55	SM0956BQ TET
56	SM0956BQ WT
57	SM0956BQ variante
58	SM0954BQ cebador D
59	SM0954BQ cebador I
60	SM0954BQ FAM
61	SM0954BQ TET
62	SM0954BQ WT
63	SM0954BQ variante
64	SM0954HQ cebador D
65	SM0954HQ cebador I
66	SM0954HQ FAM
67	SM0954HQ TET
68	SM0954HQ WT
69	SM0954HQ variante
70	SM6568 cebador D
71	SM6568 cebador I
72	SM6568 FAM
73	SM6568 TET
74	SM6568 WT
75	SM6568 variante

5

10

15

20

25

76	SM0953BQ cebador D
77	SM0953BQ cebador I
78	SM0953BQ FAM
79	SM0953BQ TET
80	SM0953BQ WT
81	SM0953BQ variante
82	SM6604 cebador D
83	SM6604 cebador I
84	SM6604 FAM
85	SM6604 TET
86	SM6604 WT
87	SM6604 variante
88	SM8040 cebador D
89	SM8040 cebador I
90	SM8040 FAM
91	SM8040 TET
92	SM8040 WT
93	SM8040 variante
94	SM8091 cebador D
95	SM8091 cebador I
96	SM8091 FAM
97	SM8091 TET
98	SM8091 WT
99	SM8091 variante

5

10

15

20

25

100	SM2918 cebador D
101	SM2918 cebador I
102	SM2918 FAM
103	SM2918 TET
104	SM2918 normal
105	SM2918 CMS
106	SM4813 cebador D
107	SM4813 cebador I
108	SM4813 FAM
109	SM4813 TET
110	SM4813 normal
111	SM4813 CMS
112	SM2914 cebador D
113	SM2914 cebador I
114	SM2914 FAM
115	SM2914 TET
116	SM2914 normal A
117	SM2914 normal B
118	SM4812 cebador D
119	SM4812 cebador I
120	SM4812 FAM
121	SM4812 TET
122	SM4812 normal A
123	SM4812 normal B

5

10

15

20

25

124	MATL WT ADNc
125	Ejemplo de ADNc de <i>matl</i> variante
126	DMP
127	Waxy1 sonda
128	Waxy1 ARNg
129	SM3158 cebador D
130	SM3158 cebador I
131	SM3158 FAM
132	SM3158 TET
133	SM3158 RWKS
134	SM3158 SYN-INBC34
135	SM4787 cebador D
136	SM4787 cebador I
137	SM4787 FAM
138	SM4787 TET
139	SM4787 RWKS
140	SM4787 SYN-INBC34
141	SM3814 cebador D
142	SM3814 cebador I
143	SM3814 FAM
144	SM3814 TET
145	SM3814 RWKS
146	SM3814 SYN-INBC34
147	SM3362 cebador D

5

10

15

20

25

148	SM3362 cebador I
149	SM3362 FAM
150	SM3362 TET
151	SM3362 RWKS
152	SM3362 SYN-INBC34
153	SM0634AQ cebador D
154	SM0634AQ cebador I
155	SM0634AQ FAM
156	SM0634AQ TET
157	SM0634AQ RWKS
158	SM0634AQ SYN-INBC34
159	SM4586 cebador D
160	SM4586 cebador I
161	SM4586 FAM
162	SM4586 TET
163	SM4586 RWKS
164	SM4586 SYN-INBC34
165	gRNA 1 (DMP)
166	gRNA 2 (DMP)
167	gRNA 3 (DMP)
168	gRNA 4 (MATL)
169	gRNA 5 (MATL)
170	gRNA 6 (MATL)
171	vector 26258

	172	Secuencia diana de ARNg de Opaque2
	173	Secuencia diana de ARNg de Waxy1
	174	Secuencia diana de ARNg de Endosperm1 amarillo
5	175	Secuencia diana de ARNg de E3 ubiquitina ligasa2
	176	Supuesta secuencia diana de ARNg de proteína ubiquitina ligasa
	177	vector 24288
10	178	cSbWUS-01
	179	cBnBBM1-02
	180	vector 25072
	181	cBdWOX5/7-v1
	182	Promotor Ubi1 de maíz
15	183	FE12949 cebador directo
	184	FE12950 cebador inverso
	185	FE12951 sonda
	186	FE12703 cebador directo
	187	FE12704 cebador inverso
20	188	FE12705 sonda
	189	FE12958 cebador directo
	190	FE12959 cebador inverso
	191	FE12960 sonda
25	192	FE12952 cebador directo

193	FE12953 cebador inverso
194	FE12954 sonda
195	FE12952 cebador directo
196	FE12956 cebador inverso
195	FE12957 sonda

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Terminología

Se pretende que todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento, a menos que se defina de otro modo posteriormente, tengan el mismo significado que interpretan habitualmente los expertos en la materia. Se pretende que las referencias a las técnicas empleadas en el presente documento se refieran a las técnicas tal como se comprenden comúnmente en la materia, incluyendo variaciones de las técnicas y/o sustituciones de técnicas equivalentes que resultarían evidentes para un experto en la materia. Si bien se cree que los siguientes términos son de uso común para los expertos en la materia, las siguientes definiciones se exponen para facilitar la explicación de la materia en cuestión que se desvela en el presente documento.

Como se usan en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye opcionalmente una combinación de dos o

más de dichas moléculas, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere al intervalo de error habitual para el respectivo valor fácilmente conocido por el experto en este campo técnico, por ejemplo $\pm 20\%$, $\pm 10\%$ o $\pm 5\%$, están dentro del significado previsto del valor mencionado.

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" o "comprenden" es indefinido. Cuando se usa en relación con un ácido nucleico (o una secuencia de aminoácidos) en cuestión, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos (o una secuencia de aminoácidos) que incluye la secuencia en cuestión como una parte o como su secuencia completa.

El término "pluralidad" se refiere a más de una entidad. Por lo tanto, una "pluralidad de individuos" se refiere al menos a dos individuos. En algunas realizaciones, el término pluralidad se refiere a más de la mitad del todo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una "pluralidad de una población" se refiere a más de la mitad de los miembros de esa población.

Una "planta" es cualquier planta en cualquier fase de desarrollo, en particular, una planta seminal. En particular, en el contexto de esta divulgación, una planta se refiere a una planta de maíz.

Una "célula vegetal" es una unidad estructural y

fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una única célula aislada o de una célula cultivada, o formar parte de una unidad con una organización superior tal como, por ejemplo, un tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta entera.

"Cultivo de células vegetales" significa cultivos de unidades de plantas, tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivos celulares, células en tejidos vegetales, polen, tubos de polen, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diversas fases de desarrollo.

Un "órgano vegetal" es una parte distinta y visiblemente estructurada y diferenciada de una planta, tal como una raíz, un tallo, una hoja, una yema floral o un embrión.

Como se usa en el presente documento, "tejido vegetal" se refiere a un grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural y funcional. Queda incluido cualquier tejido vegetal en la planta o en el cultivo. Esta expresión incluye, pero sin limitación, plantas enteras, órganos vegetales, semillas vegetales, cultivo tisular y cualquier grupo de células vegetales organizadas en unidades estructurales y/o funcionales. No se pretende que el uso de esta expresión junto con, o en ausencia de, cualquier tipo específico de tejido vegetal, tal como el que se enumera anteriormente o que esté contemplado de otro modo por esta

definición sea exclusivo de cualquier otro tipo de tejido vegetal.

La expresión "parte de planta" indica una parte de una planta, incluyendo células individuales y tejidos celulares tales como células vegetales que están intactas en las plantas, los grupos de células y cultivos tisulares a partir de los cuales se pueden regenerar las plantas. Los ejemplos de partes de plantas incluyen, pero sin limitación, células individuales y tejidos de polen, óvulos, cigotos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, partes de flores, frutos, tallos, brotes, esquejes y semillas, así como polen, óvulos, células huevo, cigotos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, partes de flores, frutos, tallos, brotes, esquejes, vástagos, portainjertos, semillas, protoplastos, callos y similares.

Los términos "variedad" o "cultivariedad" significan un grupo de plantas similares que, por características estructurales o genéticas y/o de comportamiento, se pueden distinguir de otras variedades dentro de la misma especie.

El término "población" significa un grupo genéticamente heterogéneo de plantas que comparten una derivación genética común.

El término "progenie" se refiere al o a los descendientes de un cruce particular. Típicamente, la progenie es resultado del cruce de dos individuos, aunque

algunas especies (particularmente algunas plantas y animales hermafroditas) pueden autofecundarse (es decir, la misma planta actúa como donante de los gametos tanto masculinos como femeninos). El descendiente o descendientes pueden ser, por ejemplo, de la generación F1, la F2 o cualquier generación posterior.

El término planta "descendiente" se refiere a cualquier planta resultante como progenie de una reproducción vegetativa o sexual de una o más plantas precursoras o descendientes de las mismas. Por ejemplo una planta descendiente se puede obtener mediante clonación o autopolinización de una planta precursora o mediante el cruzamiento de dos plantas precursoras e incluir autopolinizaciones así como la F1 o F2 u otras generaciones más adicionales. Una F1 es una descendencia de primera generación producida a partir de progenitores, al menos uno de los cuales se usa en el primer momento como donante de un rasgo, mientras que las descendencias de segunda generación (F2) o posteriores generaciones (F3, F4, etc.) son especímenes producidos a partir de autopolinizaciones de F1, F2, etc. Por lo tanto, una F1 puede ser un híbrido resultante de un cruce entre dos progenitores reproductores verdaderos (el mejoramiento verdadero es homocigoto para un rasgo), mientras que una F2 puede ser una descendencia resultante de la autopolinización de dichos híbridos F1.

Las expresiones "cruzadas sexualmente" y "reproducción sexual" en el contexto de la presente invención se refieren a la fusión de gametos para producir una progenie (por ejemplo, mediante fertilización, tal como para producir semillas mediante polinización en plantas). En algunas realizaciones, un "cruce sexual" o "fertilización cruzada" es la fertilización de un individuo por otro (por ejemplo, polinización cruzada en plantas). En algunas realizaciones, el término "autofecundación" se refiere a la producción de semilla mediante autofertilización o autopolinización; es decir, el polen y el óvulo son de la misma planta.

Dentro del alcance de la divulgación se entiende que "mejoramiento selectivo" se refiere a un programa de mejoramiento que usa como progenitores plantas que poseen o muestran rasgos deseables.

Las expresiones "híbrido", "planta híbrida" y "progenie híbrida", en el contexto del fitomejoramiento se refieren a una planta que es la descendencia de progenitores genéticamente distintos producidos por el cruce de plantas de diferentes líneas o reproducciones o especies, incluyendo, pero sin limitación, el cruce entre dos líneas endogámicas (por ejemplo, un individuo genéticamente heterocigoto, o principalmente heterocigoto). La expresión "híbrido F1 de un solo cruce" se refiere a un híbrido F1 producido a partir de un cruce entre dos líneas endogámicas.

La expresión "línea endogámica" se refiere a una población genéticamente homocigota o casi homocigota. Una línea endogámica, por ejemplo, puede obtenerse a través de varios ciclos de mejoramiento de hermanos/hermanas o de autofecundación. En algunas realizaciones, las líneas endogámicas reproducen de forma verdadera uno o más rasgos fenotípicos de interés. Un "endógamo", "individuo endogámico" o "progenie endogámica" es un individuo del que se han tomado muestras procedentes de una línea endogámica. El término "endogámico", significa un individuo o una línea sustancialmente homocigota. Una línea endogámica también puede denominarse "línea precursora" cuando se usa en un programa de mejoramiento.

El término "retrocruzamiento" se entiende dentro del alcance de la divulgación para referirse se refiere a un proceso en el que una progenie híbrida se retrocruza repetidamente con uno de los progenitores.

Los términos "introgresión", "introgresado" e "introgresar" se refieren a un proceso tanto natural como artificial mediante el cual las regiones genómicas de una especie, variedad o cultivariedad, se desplazan al genoma de otra especie, variedad o cultivariedad, mediante el cruzamiento de esas especies. El proceso se puede completar opcionalmente por retrocruzamiento con el progenitor recurrente.

Una planta denominada en el presente documento "haploide" tiene un número reducido de cromosomas (n) en la planta haploide, y su conjunto de cromosomas es igual al del gameto. En un organismo haploide solo está presente la mitad del número normal de cromosomas. Por lo tanto, los haploides de organismos diploides ($2n$) (por ejemplo, maíz) presentan monoploidía ($1n$); los haploides de organismos tetraploides ($4n$) (por ejemplo, ballicos) presentan diploidía ($2n$); los haploides de organismos hexaploides ($6n$) (por ejemplo, trigo) presentan triploidía ($3n$); etc. Como se usa en el presente documento, una planta a la que se hace referencia como "de dobles haploides" se desarrolla duplicando el conjunto haploide de cromosomas. Una planta o semilla que se obtiene a partir de una planta de dobles haploides que se autofecunda hasta cualquier número de generaciones se puede seguir identificando como una planta de dobles haploides. Se considera que una planta de dobles haploides es una planta homocigota. Una planta se considera que es de dobles haploides si es fértil, aunque la parte vegetativa completa de la planta no consista en las células con el conjunto doble de cromosomas; es decir, una planta se considerará de dobles haploides si contiene gametos viables, aunque sea quimérica en tejidos vegetativos.

"Recombinación" es el intercambio de hebras de ADN para producir nuevas disposiciones de secuencias de nucleótidos.

El término puede hacer referencia al proceso de recombinación homóloga que se produce en la reparación de roturas de ADN bicatenario, en donde se utiliza un polinucleótido como molde para reparar un polinucleótido homólogo. El término también
5 puede referirse al intercambio de información entre dos cromosomas homólogos durante la meiosis. La frecuencia de la recombinación doble es el producto de las frecuencias de los recombinantes individuales. Por ejemplo, un recombinante es una zona de 10 cM puede tener una frecuencia del 10 % y los
10 recombinantes dobles pueden tener una frecuencia del 10 % x 10 % = 1 % (1 centimorgan se define como un 1 % de progenie recombinante en un cruce de prueba).

Dentro del alcance de la divulgación se entiende que "planta de prueba" se refiere a una planta usada para
15 caracterizar genéticamente un rasgo en una planta a ensayar. Típicamente, la planta a ensayar se cruza con una planta de "prueba" y se puntúa la relación de segregación del rasgo en la progenie del cruce.

El término "probador" se refiere a una línea o individuo
20 con un genotipo estándar, características conocidas y un rendimiento establecido. Un "progenitor de prueba" es un individuo procedente de una línea de prueba que se usa como progenitor en un cruce sexual. Típicamente, el progenitor de prueba no está relacionado con y es genéticamente diferente
25 del individuo con el que se cruza. Normalmente, para la

evaluación fenotípica se usa un probador para generar una progenie F1 cuando se cruza con individuos o líneas endogámicas.

Las expresiones "grupo heterótico" y "combinación heterótica" se usan indistintamente y se refieren a un grupo de genotipos o líneas endogámicas que demuestran una respuesta heterótica similar cuando se cruzan con genotipos o líneas endogámicas de otros grupos de germoplasma genéticamente distintos. Existe un grado más cercano de relación genética de líneas contenidas dentro de un grupo heterótico frente a un grado más distante de relación genética de líneas comparadas entre grupos heteróticos. En general, el híbrido de dos líneas endogámicas cruzadas dentro del mismo grupo heterótico muestra mucha menos heterosis que el híbrido de una línea endogámica de un grupo heterótico cruzado con una línea endogámica de un grupo heterótico diferente. Un grupo heterótico particular puede incluir múltiples líneas que tienen una genética diversa. Los grupos heteróticos de ejemplo y las líneas de germoplasma patentadas dentro de cada grupo heterótico individual se describen en la Tabla 7. En la presente divulgación, la totalidad de los genotipos de un grupo heterótico completo también puede denominarse germoplasma del grupo heterótico. De forma amplia, las designaciones primarias para las combinaciones heteróticas son: *Stiff Stalk* ("SS", también denominada *Iowa*

Stiff Stalk Synthetic, o "BSSS"), *Non-Stiff Stalk* ("NSS"),
Tropical y Non-Stiff Stalk Iodent ("IDT"). Véase J.
Hweerwaarden, et al., Historical genomics of North American
maize, PROC. NAT'L ACAD. SCI. EE.UU. 109(31): 12420-25
5 (2012). Estas no son exclusivas, sin embargo, y se conocen
otras designaciones, por ejemplo, Lancaster Sure Crop
("LSC"). Véase, por ejemplo, C. Livini, et al., Genetic
diversity of maize inbred lines with and among heterotic
groups revealed by RFLPs, THEOR. APPL. GENET. 84: 17-25
10 (1992).

El término "heterosis" se refiere al vigor híbrido, es
decir, la función mejorada o aumentada de cualquier cualidad
biológica (por ejemplo, tamaño, tasa de crecimiento,
fertilidad, rendimiento, etc.) en una descendencia híbrida en
15 relación con sus progenitores. Por ejemplo, es probable que
la descendencia de un cruce entre líneas vegetales
endogámicas de diferentes grupos heteróticos muestre más
heterosis que sus líneas precursoras, como se ha descrito
anteriormente. Los descendientes de primera generación de tal
20 cruce generalmente muestran, en mayor medida, las
características deseadas de ambos progenitores. Esta
heterosis puede disminuir en las generaciones posteriores si
los híbridos de la primera generación se aparean entre sí.

La expresión "conjunto de semillas" se refiere a una
25 medida de la porción de una espiga de maíz que produce

embriones (es decir, granos o semillas). El conjunto de semillas puede expresarse cualitativamente (por ejemplo, bajo, bueno o alto) o cuantitativamente. En una medida cuantitativa, la medida se puede dar como un porcentaje o como un número de semillas por espiga. Generalmente, la expresión se refiere al porcentaje o número de granos normales (es decir, granos no abortados, viables en el endospermo). Para líneas de maíz normales (es decir, líneas no inductoras de haploidía), un conjunto de semillas por encima del 80 % (o más de 300 granos por espiga) se considera un buen conjunto de semillas. Para las líneas inductoras de haploidía, el conjunto de semillas tiende a ser inferior, por lo que una producción de semillas superior al 50 % (por ejemplo, superior al 60 %, superior al 70 % o superior al 80 %) o superior a 180 granos por espiga (por ejemplo, superior a 200, superior a 220, por encima de 260 o por encima de 280) generalmente se considera un conjunto de semillas alto.

Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente y, como se usan en el presente documento, se refieren tanto a cadenas codificantes como no codificantes de ARN, ADNc, ADN genómico, ADN mitocondrial y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. En realizaciones particulares, un nucleótido se refiere a un ribonucleótido, desoxinucleótido o una forma modificada de

cualquier tipo de nucleótido y combinaciones de los mismos. Las expresiones también incluyen, pero sin limitación, formas de ADN y/o ARN monocatenario y bicatenario. Además, un polinucleótido desvelado en el presente documento, por ejemplo, un molde de ADN circular, un concatémero de ácido nucleico desvelado en el presente documento, puede incluir nucleótidos naturales y modificados unidos entre sí por enlaces nucleotídicos naturales y/o no naturales. Las moléculas de ácido nucleico pueden modificarse química o bioquímicamente, o pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos y similares), enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos y similares), restos colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno y similares), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos y similares). La expresión anterior también pretende incluir cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones monocatenarias, bicatenarias, de dúplex parcial, tríplex, en horquilla, circulares y

bloqueadas. Una referencia a una secuencia de ácido nucleico abarca su complemento a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, una referencia a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse que abarca su hebra complementaria, con su secuencia complementaria. Las secuencias de nucleótidos son "complementarias" cuando se hibridan específicamente en solución (por ejemplo, de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick). El término también incluye ácidos nucleicos con codones optimizados que codifican la misma secuencia polipeptídica. También se entiende que los ácidos nucleicos pueden estar sin purificar, purificados o unidos, por ejemplo, a un material sintético tal como una matriz de perlas o columnas.

La expresión "que corresponde a", en el contexto de las secuencias de ácidos nucleicos, significa que cuando las secuencias de ácidos nucleicos de determinadas secuencias se alinean entre sí, los ácidos nucleicos que "corresponden a" determinadas posiciones enumeradas en la presente invención son los que se alinean con estas posiciones en una secuencia de referencia, pero no se encuentran necesariamente en estas posiciones numéricas exactas con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos particular de la invención. La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede realizar mediante implementaciones computarizadas de algoritmos

conocidos o mediante inspección visual. Los algoritmos de comparación de secuencias y de alineación de secuencias múltiples a los que se puede acceder fácilmente son, respectivamente, los programas Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y ClustalW/ClustalW2/Clustal Omega, que se encuentran disponibles en Internet (por ejemplo, la página web de EMBL-EBI). Otros programas adecuados incluyen, pero sin limitación, GAP, BestFit, Plot Similarity y FASTA, que forman parte del paquete Accelrys GCG comercializado por Accelrys, Inc. de San Diego, Calif., Estados Unidos de América. Véanse también Smith y Waterman, 1981; Needleman y Wunsch, 1970; Pearson y Lipman, 1988; Ausubel et al., 1988; y Sambrook y Russell, 2001.

El término "gen" se refiere a una unidad hereditaria que incluye una secuencia de ADN que ocupa una ubicación específica en un cromosoma y que contiene la instrucción genética para una característica o rasgo particular en un organismo.

La expresión "locus de rasgo cuantitativo" o "QTL" se refiere a una región de ADN que está asociada con un rasgo fenotípico particular, es decir, un fenotipo que puede medirse numéricamente y varía en grado, y que puede atribuirse a efectos poligénicos, es decir, el producto de dos o más genes, y su entorno. Típicamente, los QTL subyacen a los rasgos continuos (aquellos rasgos que varían

continuamente, por ejemplo, la tasa de inducción de haploidía) a diferencia de los rasgos cualitativos (es decir, discretos).

El término "alelo(s)" significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen, en donde todos los alelos se refieren al menos a un rasgo o característica. En una célula diploide, los dos alelos de un gen dado ocupan locus correspondientes en un par de cromosomas homólogos. En algunos casos (por ejemplo, para los QTL) es más preciso referirse a "haplotipo" (es decir, un alelo de un segmento cromosómico) en lugar de "alelo", sin embargo, debería entenderse en estos casos que el término "alelo" comprende el término "haplotipo". Si dos individuos (por ejemplo, dos plantas) poseen los mismos alelos en un locus particular, los alelos se denominan "idénticos por descendencia" si los alelos fueron heredados de un ancestro común (es decir, los alelos son copias del mismo alelo precursor). La alternativa es que los alelos sean "idénticos por el estado" (es decir, los alelos parecen ser los mismos, pero se obtienen de dos copias diferentes del alelo). La identidad de información por descendencia es útil para estudios de enlace; tanto la información de identidad por descendencia como de identidad por el estado se pueden usar en estudios de asociación, aunque la identidad de información por descendencia puede ser particularmente útil.

El término "haplotipo" puede referirse al conjunto de alelos de un individuo heredado de un progenitor. Por lo tanto, un individuo diploide tiene dos haplotipos. El término "haplotipo" se puede usar en un sentido más limitado para referirse a marcadores genéticos físicamente unidos y/o no unidos (polimorfismos de secuencia) asociados con un rasgo fenotípico. La expresión "bloqueo haplotípico" (denominado algunas veces también en la bibliografía simplemente como haplotipo) se refiere a un grupo de dos o más marcadores genéticos que están físicamente unidos en un único cromosoma (o una porción del mismo). Típicamente, cada bloque tiene unos pocos haplotipos comunes, y se puede seleccionar un subconjunto de los marcadores genéticos (es decir una "etiqueta de haplotipo") que identifica únicamente cada uno de estos haplotipos.

El término "genotipo" y variantes del mismo se refieren a la composición genética de un organismo, incluyendo, por ejemplo, si un organismo diploide es heterocigoto (es decir, tiene dos alelos diferentes para un gen o QTL determinado) u homocigoto (es decir, tiene el mismo alelo para un gen o QTL determinado) para uno o más genes o locus (por ejemplo, un SNP, un haplotipo, una mutación genética, una inserción o una delección). Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos heterocigoto" para un alelo particular indica que está presente al menos una copia del alelo. Por ejemplo, una

planta de maíz que es al menos heterocigota para un alelo HI de un gen tiene una o dos copias (es decir, es heterocigota u homocigota) del alelo HI.

5 Dentro del alcance de la presente divulgación se entiende que "fenotipo" se refiere a una o más características distinguibles de un rasgo controlado genéticamente. La expresión "rasgo fenotípico" se refiere a la aparición u otra característica detectable de un individuo, dando como resultado la interacción de su genoma
10 con el entorno.

 La expresión "rasgo cualitativo" se refiere a un rasgo fenotípico que está controlado por uno o unos pocos genes que presentan efectos fenotípicos importantes que pueden describirse como una categoría que tiene dos o más valores de
15 carácter. Debido a esto, normalmente los rasgos cualitativos tan solo se heredan. Los ejemplos en plantas incluyen, pero sin limitación, el color de la flor, el color de la mazorca, y la resistencia a la enfermedad tal como, por ejemplo, resistencia al tizón de la hoja de maíz boreal.

20 El término "polimorfismo" y variantes del mismo se refieren a la aparición de dos o más alelos o secuencias alternativas determinadas genéticamente en una población. Un "sitio polimórfico" se refiere al locus en el que se produce la divergencia. Los sitios polimórficos preferidos tienen al
25 menos dos alelos, cada uno de los cuales aparece con una

frecuencia particular en una población. Un locus polimórfico puede ser tan pequeño como un par de bases. Uno de los alelos de un polimorfismo se designa arbitrariamente como alelo de referencia, y otros alelos se designan como alelos alternativos, "alelos variantes" o "varianzas". El alelo que aparece con mayor frecuencia en una población seleccionada a veces se puede denominar alelo de "tipo silvestre". Los organismos diploides pueden ser homocigotos o heterocigotos para los alelos variantes. El alelo variante puede o no producir una característica física o bioquímica observable (fenotipo) en un individuo portador del alelo variante. Por ejemplo, un alelo variante puede alterar la actividad enzimática de una proteína codificada por un gen de interés o, como alternativa, el alelo variante puede no tener efecto sobre la actividad enzimática de una proteína codificada.

Como se usa en el presente documento, los términos y expresiones "marcador", "marcador polimórfico" o "marcador genético" se refieren a un gen o secuencia de ADN con un locus cromosómico conocido que indica la presencia o ausencia de un alelo. Un marcador puede estar dentro o ligado al gen que se usa para genotipificar. Un marcador puede obtenerse de secuencias genómicas de nucleótidos o de productos codificados de las mismas (por ejemplo, un transcrito de ARNm, un transcrito de ARN no codificante o una proteína). El término también se refiere a secuencias de nucleótidos

complementarias a las secuencias de los marcadores, o que las flaquean, tales como secuencias de nucleótidos usadas como sondas y/o cebadores capaces de amplificar la secuencia de marcador. El término también puede referirse a la ausencia de

5 secuencias de nucleótidos complementarias o que flaquean un polimorfismo. Los marcadores pueden incluir, pero sin limitación, polimorfismos de nucleótido único (SNP), variantes de nucleótido único (SNV), pequeñas inserciones o

10 deleciones (indeles), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), número variable de repeticiones en tándem (VNTR), regiones hipervariables, minisatélites, repeticiones de dinucleótidos, repeticiones de trinucleótidos, repeticiones de tetranucleótidos, repeticiones de secuencias simples y elementos de inserción

15 tales como transposones.

La expresión "mutación de pérdida de función" es un cambio en la secuencia de ADN de un gen (es decir, una "mutación") que da como resultado que el producto génico mutado carezca de la función molecular del gen de tipo

20 silvestre. Existen cuatro variaciones genéticas principales que pueden conducir a mutaciones de pérdida de función: 1) una mutación que da como resultado un codón finalizador prematuro que produce una secuencia de proteína truncada; 2) una mutación que aparece en un sitio de corte y empalme

25 canónico que afecta al corte y empalme (que da como resultado

la inclusión de un intrón o la exclusión de un exón en el transcrito de ARNm); 3) una variante de inserción o deleción con múltiplos no integrales de tres ubicados en la región codificante del gen, que causan cambios del marco de lectura al interrumpir el transcrito de longitud completa; y 4) mutaciones que dan como resultado la pérdida de un codón iniciador (codón iniciador de la transcripción, por ejemplo, ATG), que impiden la transcripción génica si no hay un codón iniciador alternativo cerca de la mutación. Además, las mutaciones en el promotor o las regiones no traducidas (UTR, por sus siglas en inglés) de un gen pueden reducir o eliminar la expresión génica, lo que conduce a una pérdida de función.

Dentro del alcance de la presente divulgación se entiende que "selección basada en marcadores" se refiere al uso de marcadores genéticos para detectar uno o más ácidos nucleicos de la planta, en donde el ácido nucleico está asociado con un rasgo deseado para identificar plantas que transportan genes para rasgos deseables (o no deseables), de modo que estas plantas puedan usarse (o evitarse) para cualquier fin, por ejemplo, en un programa de transformación o en un programa de mejoramiento selectivo. Como se usa en el presente documento, un marcador indicativo de citoplasma A normal discriminaría entre plantas sin CMS que tienen un citoplasma B normal y las que no tienen el citoplasma B normal, es decir, que tienen el citoplasma A normal. Un

marcador puede ser una mutación en un locus de un genoma (por ejemplo, un polimorfismo de nucleótido único ("SNP") o una mutación en un alelo.

5 Como se usan en el presente documento, los términos "sonda marcadora" y "sonda" se refieren a una secuencia de nucleótidos o una molécula de ácido nucleico que se puede usar para detectar la presencia o ausencia de una secuencia (por ejemplo, un marcador desvelado en el presente documento) dentro de una secuencia mayor. En algunas realizaciones, una
10 sonda de ácido nucleico es complementaria a la totalidad o una porción del marcador o locus del marcador y puede detectar la presencia o ausencia del marcador mediante, por ejemplo, hibridación de ácidos nucleicos. La longitud de la sonda marcadora puede variar. En algunas realizaciones, una
15 sonda marcadora tiene una longitud en un intervalo de 8-200 nucleótidos, por ejemplo, entre 10 y 100 nucleótidos, o entre 15 y 60 nucleótidos. En algunas realizaciones, aproximadamente 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos contiguos de la sonda son
20 complementarios al marcador y pueden usarse para la hibridación de ácidos nucleicos.

Como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con un ácido nucleico diana (en algunas
25 realizaciones, hibridarse específicamente con un ácido

nucleico diana) permitiendo que se adhiera al mismo una ADN-polimerasa y/o transcriptasa inversa y, de este modo, actúa como un punto de iniciación para la síntesis de ADN cuando se somete a condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebadores (por ejemplo, en presencia de nucleótidos y un agente de polimerización tal como la ADN-polimerasa y a una temperatura y pH adecuados). En algunas realizaciones, se emplean una o más pluralidades de cebadores para amplificar ácidos nucleicos vegetales (por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa; PCR).

Como se usa en el presente documento, la expresión "asociado con" se refiere a una relación reconocible y/o ensayable entre dos entidades. Por ejemplo, la expresión "asociado con la inducción de haploidía (HI)" se refiere a un rasgo, locus, gen, alelo, marcador, fenotipo, etc., o el producto de expresión de los mismos, cuya presencia o ausencia puede influir o indicar un nivel y/o grado en el que la planta o su progenie exhibe HI. En este sentido, un marcador está "asociado con" un rasgo cuando está relacionado con él y cuando la presencia del marcador es un indicador de si el rasgo o la forma del rasgo deseado aparecerá en una planta/germoplasma que comprenda el marcador y/o en qué medida. De manera similar, un marcador está "asociado con" un alelo cuando está unido al mismo y cuando la presencia (o ausencia) del marcador es un indicador de si el alelo está

presente (o ausente) en una planta, germoplasma o población que comprende el marcador. Por ejemplo, "un marcador asociado con HI" se refiere a un marcador cuya presencia o ausencia se puede usar para predecir si una planta mostrará inducción de haploidía y/o en qué medida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "material vegetal" se refiere a semillas, embriones u otro tejido regenerativo procedente de una sola espiga de maíz o un par de espiga, o plantas cultivadas a partir de las mismas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "línea vegetal" se refiere a un único material vegetal o un conjunto de materiales genéticamente idénticos.

El término "germoplasma" se refiere a la totalidad de los genotipos de una población u otro grupo de individuos (por ejemplo, una especie o línea vegetal). La expresión "germoplasma adaptado" se refiere a materiales vegetales de superioridad genética probada; por ejemplo, para un entorno o zona geográfica determinados, mientras que las expresiones "germoplasma no adaptado", "germoplasma bruto" y "germoplasma exótico" se refieren a materiales vegetales de valor genético desconocido o no probado; por ejemplo, para un entorno o zona geográfica determinados; así, la expresión "germoplasma no adaptado" se refiere en algunas realizaciones a materiales vegetales que no forman parte de una población reproductora

establecida y que no tienen una relación conocida con un miembro de la población reproductora establecida.

El término "citotipo" se refiere a la clasificación del citoplasma, incluida la contribución genética de las mitocondrias y los cloroplastos, asociados con una línea vegetal. Los citotipos actualmente conocidos incluyen el citoplasma A normal ("NA") y el citoplasma B normal ("NB"), pero también incluyen los citotipos citoplasmáticos masculinos estériles: citoplasma C citoplasmático masculino estéril ("C" o "CMS-C"), citoplasma S citoplasmático masculino estéril ("S" o "CMS-S") y citoplasma T citoplasmático masculino estéril ("T" o "CMS-T"). Los términos citotipo y citoplasma se usan indistintamente.

"Transformable", "transformabilidad" y similares, se refieren a una planta, a una línea de plantas o a una célula vegetal (tal como un tejido del callo o un protoplasto) que acepta más fácilmente ADN extraño y puede integrar de forma estable el ADN extraño en su genoma.

"Frecuencia de transformación", "TF", "eficacia de transformación" y "tasa de transformación" significan una medida del número de plantas transformadas con éxito dividido entre el número total de plantas (por ejemplo, embriones) que se intentaron transformar. Esta medida puede expresarse cuantitativamente, por ejemplo, como un porcentaje o un número bruto, o cualitativamente, por ejemplo, "bajo" o

"alto".

El término "alelo TF" se refiere a un alelo de un gen o locus cuya presencia en una planta (por ejemplo, una planta de maíz) está asociada con un aumento de la TF en comparación con los alelos alternativos para el mismo gen o locus. En algunos casos, un alelo TF es un alelo de un gen, QTL o locus en un QTL.

El término "TF-QTL" se refiere a un QTL que está asociado con un aumento de la frecuencia de transformación (TF, por sus siglas en inglés). La presencia de un alelo TF en un TF-QTL da como resultado un aumento de TF en comparación con la presencia de un alelo no TF en el TF-QTL.

Como se usa en la presente, "resistente" se refiere a una línea vegetal que es no transformable o esencialmente no transformable. En otras palabras, su eficacia de transformación es del 0 % o esencialmente del 0 %. El término resistente es sinónimo de "no transformable", y estos términos se usan indistintamente.

La expresión "tasa de inducción de haploidía" o "HIR" se refiere al número de granos haploides supervivientes dividido por el número total de granos después de polinizar una espiga con polen inductor de haploidía.

El término "alelo HI" se refiere a un alelo de un gen o locus cuya presencia en una planta (por ejemplo, una planta de maíz) está asociada con un aumento de la HI en comparación

con los alelos alternativos para el mismo gen o locus. En algunos casos, un alelo HI es un alelo de un gen, QTL o locus en un QTL.

5 El término "HI-QTL" se refiere a un QTL que está asociado con la inducción de haploidía (HI). La presencia de un alelo HI en un HI-QTL da como resultado un aumento de la tasa de inducción de haploidía (HIR) en comparación con la presencia de un alelo no HI en el HI-QTL. Un HI-QTL de ejemplo es *ghir8*, ubicado en el cromosoma 9 entre la posición 3,444,422 y la posición 11,360,090 en el genoma de referencia B73v5.

II. Plantas de maíz HI-NA

En un aspecto, el presente documento proporciona plantas de maíz que poseen al menos dos características: 1) la capacidad de inducir eficazmente la inducción de haploidía; y 2) un alto nivel de transformabilidad. En algunas realizaciones, las plantas de maíz son homocigotas para una mutación de pérdida de función en un gen de la fosfolipasa A2 α de tipo patatina (MATL) y al menos heterocigotas para un alelo HI en al menos un HI-QTL. En algunas realizaciones, el HI-QTL puede ser *ghir8* (ubicado en el cromosoma 9 entre la posición 3,444,422 y la posición 11,360,090 en el genoma de referencia B73v5). Las plantas de maíz proporcionadas en el presente documento también tienen un citotipo A normal ("NA"), que contribuye, en algunas realizaciones, a un

aumento de la transformabilidad. En algunas realizaciones, las plantas de maíz son al menos heterocigotas para un alelo TF en al menos un gen o QTL asociado con un aumento de la transformabilidad. En algunas realizaciones, las plantas de
5 maíz también presentan una alta carga de polen y/o peso de la borla.

A. Inducción de haploidía

Comúnmente, durante el mejoramiento por inducción de haploidía, ambas líneas precursoras usadas en el cruce de
10 inducción son diploides, por lo que sus gametos (es decir, óvulos y espermatozoides) son haploides. La inducción de haploidía es con frecuencia un rasgo de penetración de medio a bajo de la línea inductora, por lo que la progenie resultante, según la especie o la situación, puede ser
15 diploide (si no se produce la eliminación del genoma) o haploide (si se produce la eliminación del genoma). Por lo tanto, como se usa en el presente documento, los "haploides" poseen la mitad del número de cromosomas de cualquier progenitor; por lo tanto, los haploides de organismos
20 diploides (por ejemplo, maíz) presentan monoplodía; los haploides de organismos tetraploides (por ejemplo, ballicos) presentan diplodía; los haploides de organismos hexaploides (por ejemplo, trigo) presentan triplodía.

En algunas realizaciones, la inducción de haploidía se
25 logra cruzando la línea masculina inductora de haploidía con

otra línea, lo que da como resultado la inducción de la pérdida del conjunto de cromosomas de la línea inductora de haploidía y la producción de embriones haploides (es decir, inducción de haploidía eficiente). La eficiencia de inducción de haploidía puede representarse como tasa de inducción de haploidía ("HIR"), que es el porcentaje del total de embriones de progenie que son haploides de un cruce entre una línea inductora de haploidía y otra línea. Los métodos de ejemplo para determinar la HIR se describen en la Sección II.B y también en los Ejemplos de la presente divulgación. Como se describe en el presente documento, los alelos HI variantes en varios locus genómicos pueden promover una inducción de haploidía eficiente (por ejemplo, HIR de al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 12 % o al menos el 15 %). En algunas realizaciones, el alelo HI es un alelo del gen de la fosfolipasa A2 α de tipo patatina (PLPA2 α , ID del gen B73 del maíz GRMZM2G471240 en el cromosoma 1 [este ID del gen es del genoma B73_v4] también conocido como Zm00001d029412 [B73_v5], también conocido como MATRILINEAL [MATL], NOT LIKE DAD1 [NLD1] y PHOSPHOLIPASE A1 [PLA1]). Además, como se describe en el presente documento, los alelos HI en diversos HI-QTL también pueden promover la inducción de haploidía. En algunas realizaciones, el alelo HI puede estar en el *ghir8* HI-QTL en el cromosoma 9.

En algunas realizaciones, las plantas de maíz desveladas

en el presente documento comprenden un alelo HI en el gen MATL. En algunas realizaciones, el alelo HI es una mutación de pérdida de función en MATL (generalmente denominada *matl*). En algunas realizaciones, el alelo variante comprende una mutación del marco de lectura de inserción de cuatro pares de bases en la secuencia codificante de MATL. En algunas realizaciones, la inserción de cuatro pares de bases corresponde a los cuatro nucleótidos en las posiciones 1146-1149 de SEQ ID NO:125. En algunas realizaciones, el alelo variante comprende una mutación diferente (es decir, distinta de la mutación de inserción de cuatro pares de bases) o mutaciones diferentes que dan como resultado una pérdida de función en el producto proteico codificado por MATL. Cualquier ensayo que sea capaz de identificar una mutación de pérdida de función en MATL puede usarse para identificar las plantas descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el ensayo puede comprender uno de los métodos de genotipado descritos en la Sección II.E a continuación. En algunas realizaciones, el ensayo para identificar una mutación de pérdida de función en MATL puede desarrollarse basándose en la secuencia de ADNc de tipo silvestre del gen (SEQ ID NO:124).

En algunas realizaciones, el ensayo para identificar una mutación de pérdida de función en MATL comprende genotipificar un individuo en uno o más de los marcadores

SM7246, SM7252, Ensayo 2826 y Ensayo 2827. En algunas realizaciones, los genotipos en estos marcadores pueden detectarse usando un ensayo de PCR en tiempo real TaqMan® (por ejemplo, de acuerdo con los métodos detallados en la Sección II.E o en el Ejemplo 1 del presente documento). La Tabla 1 enumera los genotipos esperados y los contextos de secuencia en cada uno de estos marcadores, de acuerdo con algunas realizaciones, junto con cebadores y sondas de ejemplo que pueden usarse en ensayos de genotipado de PCR en tiempo real TaqMan. Los ensayos TaqMan descritos en la Tabla 1 para los marcadores SM7246 y SM7252 comprenden cada uno dos sondas con diferentes fluoróforos que pueden distinguir entre los genotipos enumerados. Los ensayos TaqMan descritos en la Tabla 1 para el Ensayo 2826 y el Ensayo 2827 implican cada uno la amplificación y la detección basada en sondas fluorescentes de una porción del locus genómico MATL y un control para la comparación. En algunas realizaciones, la sonda específica de MATL en el Ensayo 2826 detecta la secuencia MATL de tipo silvestre (es decir, la secuencia mutante no se detecta). En algunas realizaciones, la sonda específica *matl* en el Ensayo 2827 detecta la secuencia *matl* mutante de pérdida de función con una inserción de 4 pb (es decir, no se detecta la secuencia de tipo silvestre).

Tabla 1. Marcadores de ejemplo usados para genotipificar una mutación de pérdida de función en MATL.

Marcador	SM7246	SM7252	Ensayo 2826	Ensayo 2827
Ubicación (genoma de referencia B73v5)	Cr 1 69430544	Cr 1 69430644	Cr 1 69430644	Cr 1 69430644
Genotipo MATL de tipo silvestre y contexto de secuencia	C/C SEQ ID NO:5	D/D SEQ ID NO:11	D/D	D/D (no detectado)
Genotipo <i>matl</i> mutante y contexto de secuencia	G/G SEQ ID NO:6	I/I SEQ ID NO:12	I/I (no detectado)	I/I
Cebador D	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:13 (MATL) SEQ ID NO:14 (control)	SEQ ID NO:19 (<i>matl</i>) SEQ ID NO:14 (control)
Cebador I	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:15 (MATL) SEQ ID	SEQ ID NO:20 (<i>matl</i>) SEQ ID

			NO:16 (control)	NO:16 (control)
5	Sondas	SEQ ID NOS: 3-4	SEQ ID NOS: 9-10 NO:17 (MATL) SEQ ID NO:18 (control)	SEQ ID NO:21 (<i>matl</i>) SEQ ID NO:18 (control)

10 C/C: homocigoto para citosina en el marcador; G/G: homocigoto para guanina en el marcador; I/I: homocigoto para el alelo mutante de inserción de 4 pb en el marcador; D/D: homocigoto para el alelo WT sin inserción de 4 pb en el marcador.

15 En algunas realizaciones, el ensayo para identificar una mutación de pérdida de función en MATL puede ser un ensayo fenotípico. Por ejemplo, los niveles de la proteína codificada por la secuencia MATL mutada pueden detectarse mediante cualquiera de una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, transferencia de Western, inmunofluorescencia, espectrometría de masas, etc.).

20 En algunas realizaciones, pueden usarse ensayos funcionales para determinar si la proteína codificada por la secuencia MATL mutada puede realizar su función habitual. Por ejemplo, las plantas que comprenden supuestas mutaciones de MATL

25 pueden cruzarse con plantas de prueba para evaluar los rasgos

relevantes para la función normal de la proteína codificada por MATL (por ejemplo, conjunto de semillas o tasa de inducción de haploidía, como se detalla en los Ejemplos a continuación).

5 En algunas realizaciones, las plantas de maíz desveladas en el presente documento comprenden un alelo HI en al menos un alelo de locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con un aumento de la inducción de haploidía (HI-QTL). En algunas realizaciones, las plantas de maíz son al menos heterocigotas
10 (por ejemplo, heterocigotas u homocigotas) para un alelo HI en al menos un HI-QTL. En algunas realizaciones, las plantas de maíz son homocigotas para un alelo HI en al menos un HI-QTL. En algunas realizaciones, las plantas de maíz que son homocigotas para un alelo HI en un HI-QTL muestran una
15 inducción de haploidía más eficaz en relación con las plantas de maíz que son heterocigotas para el alelo HI en el HI-QTL. En algunas realizaciones, las plantas de maíz comprenden un alelo HI en el *qhir8* HI-QTL en el cromosoma 9. Cualquier ensayo que sea capaz de identificar o genotipificar un QTL
20 puede usarse para identificar las plantas que comprenden el alelo HI en el *qhir8* HI-QTL como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el ensayo para identificar el alelo HI en el *qhir8* HI-QTL puede comprender uno de los métodos de genotipado descritos en la Sección II.E
25 a continuación. En algunas realizaciones, el ensayo para

identificar el alelo HI en el *ghir8* HI-QTL puede desarrollarse basándose en cualquiera de los marcadores *ghir8* HI-QTL conocidos. En algunas realizaciones, el ensayo para identificar el alelo HI en el *ghir8* HI-QTL puede desarrollarse basándose en cualquier diferencia entre la secuencia de tipo silvestre del locus y la secuencia del alelo variante del locus asociado con un aumento de la inducción de haploidía.

En algunas realizaciones, el ensayo para identificar el alelo HI en el *ghir8* HI-QTL comprende genotipificar un individuo en uno o más de los marcadores SM4849, SM8047, SM8133, SM8029, SM4257 y SM0956BQ. En algunas realizaciones, los genotipos en estos marcadores pueden detectarse usando un ensayo de PCR en tiempo real TaqMan (por ejemplo, de acuerdo con los métodos detallados en la Sección E o en el Ejemplo 1 del presente documento). La Tabla 2 enumera los genotipos esperados y los contextos de secuencia en cada uno de estos marcadores, de acuerdo con algunas realizaciones, junto con cebadores y sondas de ejemplo que pueden usarse en ensayos de genotipado de PCR en tiempo real TaqMan.

Tabla 2. Marcadores de ejemplo usados para genotipificar el *ghir8* HI-QTL.

Marcador	SM4849	SM8047	SM8133	SM8029	SM4257	SM0956 BQ

5

10

15

20

25

Ubicación (genoma de referenci a B73v5)	Cr 9 3444422	Cr 9 3880187	Cr 9 392000 9	Cr 9 458031 7	Cr 9 724835 2	Cr 9 113600 90
Genotipo de tipo silvestre y contexto de secuencia	G/G SEQ ID NO:26	A/A SEQ ID NO:32	G/G SEQ ID NO:38	G/G SEQ ID NO:44	C/C SEQ ID NO:50	A/A SEQ ID NO:56
Genotipo de alelo HI <i>qhir8</i> y contexto de secuencia	A/A SEQ ID NO:27	T/T SEQ ID NO:33	C/C SEQ ID NO:39	A/A SEQ ID NO:45	G/G SEQ ID NO:51	G/G SEQ ID NO:57
Cebador D	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:52
Cebador I	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:53

	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
Sondas	NOS:	NOS:	NOS:	NOS:	NOS:	NOS:
	24-25	30-31	36-37	42-43	48-49	54-55

5 A/A: homocigoto para adenina en el marcador; T/T:
homocigoto para timina en el marcador; C/C: homocigoto para
citosina en el marcador; G/G: homocigoto para guanina en el
marcador.

10 En algunas realizaciones, el alelo HI en el *qhir8* HI-QTL
comprende un alelo variante en el gen de la proteína de
membrana 7 (DMP) del dominio DUF679 (Zm00001d044822 en el
genoma de referencia B73v5) que se encuentra en el *qhir8* HI-
QTL. Véase, por ejemplo, Zhong, et al., 2019, "Mutation of
ZmDMP enhances haploid induction in maize", Nature Plants
5:575-580. En algunas realizaciones, las plantas de maíz son
15 al menos heterocigotas (por ejemplo, heterocigotas u
homocigotas) para el alelo variante HI en el gen DMP. En
algunas realizaciones, el alelo variante es una mutación de
pérdida de función en DMP. Cualquier ensayo que sea capaz de
identificar una mutación de pérdida de función en DMP puede
20 usarse para identificar las plantas descritas en el presente
documento. En algunas realizaciones, el ensayo puede
comprender uno de los métodos de genotipado descritos en la
Sección E a continuación. En algunas realizaciones, el ensayo
para identificar una mutación de pérdida de función en DMP
25 puede desarrollarse basándose en la secuencia de tipo

silvestre del gen (SEQ ID NO:126).

En algunas realizaciones, el ensayo para identificar una mutación de pérdida de función en DMP puede ser un ensayo fenotípico. Por ejemplo, los niveles de la proteína codificada por DMP pueden detectarse mediante cualquiera de una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, transferencia de Western, inmunofluorescencia, espectrometría de masas, etc.). En algunas realizaciones, pueden usarse ensayos funcionales para determinar si la proteína codificada por DMP puede realizar su función habitual. Por ejemplo, las plantas que comprenden supuestas mutaciones de DMP pueden cruzarse con plantas de prueba para evaluar los rasgos relevantes para la función normal de la proteína codificada por DMP (por ejemplo, conjunto de semillas o tasa de inducción de haploidía, como se detalla en los Ejemplos a continuación).

En algunas realizaciones, las plantas de maíz descritas en el presente documento comprenden al menos un marcador seleccionable para facilitar el cribado y la selección de la descendencia de interés (por ejemplo, granos de descendencia que se han vuelto haploides). Como se usa en el presente documento, la expresión marcador seleccionable abarca marcadores de cribado o indicadores (por ejemplo, indicadores de color que se pueden usar para cribar visualmente la descendencia de interés) y marcadores de selección (por

ejemplo, genes de resistencia a los antibióticos que se pueden usar para el enriquecimiento mediado por antibióticos de la descendencia de interés). En algunas realizaciones, las plantas comprenden un gen marcador seleccionable. El gen
5 marcador seleccionable puede ser, por ejemplo, una mutación de un gen endógeno o un transgén. En algunas realizaciones, el gen marcador seleccionable codifica un producto proteico detectable. En algunas realizaciones, las plantas son heterocigotas para un marcador seleccionable. En algunas
10 realizaciones, las plantas son homocigotas para un marcador seleccionable. En algunas realizaciones, el gen marcador seleccionable codifica un pigmento u otro producto detectable que solo estará presente en embriones diploides, lo que facilita la selección de embriones haploides, como se detalla
15 a continuación y en los Ejemplos. En algunas realizaciones, el marcador seleccionable puede incluir uno cualquiera de GUS, PMI, PAT, GFP, RFP, CFP, B1, CI, NPTII, HPT, ACC3, AADA, alto contenido de aceite (véanse, por ejemplo, Melchinger et al. 2013. *Sci. Reports* 3:2129 y Chaikam et al. 2019. *Theor.*
20 *and Appl. Genet.* 132:3227-3243), R-navajo (R-nj), R1-scutellum (R1-SCM2) y/o un pigmento de antocianina. Los expertos en la materia conocen otros genes marcadores seleccionables (véase, por ejemplo, Ziemienowicz. 2001. *Acta Physiologiae Plantarum* 23:363-374). En algunas realizaciones,
25 el marcador seleccionable comprende un gen de resistencia a

antibióticos.

En algunas realizaciones, el marcador seleccionable comprende los alelos variantes R-navajo ("R-nj") o R1-scutellum ("R1-SCM2") en el locus R1 en el cromosoma 10 (en torno a la posición ~139 Mb a ~140 Mb en el genoma de referencia B73v5). Estos alelos confieren un rasgo de antocianina dominante que expresará un color púrpura o rojo tanto en el embrión como en el endospermo de la semilla. El alelo R-nj está asociado con una expresión de antocianina muy fuerte en la capa de aleurona (la capa más externa del endospermo) y una expresión más débil en el embrión. El alelo R1-SCM2 está asociado con una fuerte expresión de antocianina en el escutelo del embrión y una expresión más débil en la capa de aleurona. Los embriones diploides resultantes de un cruce entre una línea inductora de haploidía que comprende estos alelos expresados de forma dominante y otra línea mostrarán un color púrpura o rojo. Los embriones que han perdido el conjunto de cromosomas precursores de la línea inductora de haploidía no mostrarán el color.

Puede usarse cualquier ensayo que sea capaz de distinguir entre el locus R1 de tipo silvestre y los alelos variantes R-nj y/o R1-SCM2 para identificar las plantas descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el ensayo puede comprender uno de los métodos de genotipado descritos en la Sección E a continuación. En algunas

realizaciones, el ensayo puede desarrollarse basándose en la secuencia de tipo silvestre del locus y/o la secuencia de los alelos variantes R-nj y/o R1-SCM2.

En algunas realizaciones, el ensayo para identificar una planta que comprende el alelo variante R1-SCM2 en el locus R1 comprende genotipificar un individuo en uno o más de los marcadores SM0954, SM0954HQ, SM6568, SM0953BQ y SM6604. En algunas realizaciones, los genotipos en estos marcadores pueden detectarse usando un ensayo de PCR en tiempo real TaqMan (por ejemplo, de acuerdo con los métodos detallados en la Sección E o en el Ejemplo 1 del presente documento). La Tabla 3 enumera los genotipos esperados y los contextos de secuencia en cada uno de estos marcadores, de acuerdo con algunas realizaciones, junto con cebadores y sondas de ejemplo que pueden usarse en ensayos de genotipado de PCR en tiempo real TaqMan.

Tabla 3. Marcadores de ejemplo usados para genotipificar el locus R1.

Marcador	SM0954BQ	SM0954HQ	SM6568	SM0953BQ	SM6604
Ubicación (genoma de referencia)	Cr 10 139300360	Cr 10 139300732	Cr 10 139789170	Cr 10 140146379	Cr 10 139789786

	B73v5)					
5	Genotipo	A/A	A/A	A/A	G/G	A/A
	de tipo	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
	silvestre y	NO:62	NO:68	NO:74	NO:80	NO:86
	contexto de secuenciación					
10	Genotipo	C/C	G/G	T/T	A/A	G/G
	R1-SCM2	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
	y	NO:63	NO:69	NO:75	NO:81	NO:87
	contexto de secuenciación					
15	Cebador	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
	D	NO:58	NO:64	NO:70	NO:76	NO:82
	Cebador	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
20	I	NO:59	NO:65	NO:71	NO:77	NO:83
	Sondas	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
		NOS: 60-61	NOS: 66-67	NOS: 72-73	NOS: 78-79	NOS: 84-85

25 A/A: homocigoto para adenina en el marcador; T/T: homocigoto para timina en el marcador; C/C: homocigoto para

citosina en el marcador; G/G: homocigoto para guanina en el marcador.

En algunas realizaciones, las plantas de maíz descritas en el presente documento comprenden un alelo de tipo silvestre en un locus inhibidor de color en el cromosoma 9 ubicado entre la posición 8 Mb y 10 Mb en el genoma de referencia B73v5. En algunas realizaciones, las plantas son al menos heterocigotas (por ejemplo, heterocigotas u homocigotas) para un alelo de tipo silvestre en el locus inhibidor de color. Un alelo variante en este locus inhibidor de color puede reducir la pigmentación púrpura y/o roja en el embrión de una línea de maíz que comprende el alelo R1-SCM2 en el locus R1. La pigmentación reducida puede dificultar la distinción de embriones de color púrpura o rojo (es decir, embriones diploides) de embriones de color blanco o crema (es decir, embriones haploides). En algunas realizaciones, la selección de plantas de maíz que no tienen este alelo variante en el locus inhibidor de color puede garantizar que la descendencia diploide de dichas plantas muestre un fuerte color púrpura o rojo, lo que las hace fáciles de distinguir de los embriones haploides de color blanco o crema. En algunas realizaciones, esta selección se logra seleccionando plantas con un alelo de tipo silvestre en el locus inhibidor de color. Puede usarse cualquier ensayo que sea capaz de distinguir entre el locus inhibidor de color de tipo

silvestre y el alelo variante para identificar las plantas descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el ensayo puede comprender uno de los métodos de genotipado descritos en la Sección E a continuación. En algunas realizaciones, el ensayo puede desarrollarse basándose en la secuencia de tipo silvestre del locus y/o la secuencia del alelo variante inhibidor de color.

En algunas realizaciones, el ensayo para identificar un alelo de tipo silvestre en el locus inhibidor de color del cromosoma 9 comprende genotipificar un individuo en uno o ambos marcadores SM8040 y SM8091. En algunas realizaciones, los genotipos en estos marcadores pueden detectarse usando un ensayo de PCR en tiempo real TaqMan (por ejemplo, de acuerdo con los métodos detallados en la Sección E o en el Ejemplo 1 del presente documento). La Tabla 4 enumera los genotipos esperados y los contextos de secuencia en cada uno de estos marcadores, de acuerdo con algunas realizaciones, junto con cebadores y sondas de ejemplo que pueden usarse en ensayos de genotipado de PCR en tiempo real TaqMan.

Tabla 4. Marcadores de ejemplo usados para genotipificar el locus inhibidor de color del cromosoma 9.

Marcador	SM8040	SM8091
Ubicación (genoma de referencia B73v5)	Cr 9 8120045	Cr 9 10040065
Genotipo de tipo	G/G	C/C

silvestre y contexto de secuencia	SEQ ID NO:92	SEQ ID NO:98
Genotipo de alelo inhibidor de color y contexto de secuencia	A/A SEQ ID NO:93	A/A SEQ ID NO:99
Cebador D	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:94
Cebador I	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:95
Sondas	SEQ ID NOS: 90-91	SEQ ID NOS: 96-97

10 A/A: homocigoto para adenina en el marcador; C/C: homocigoto para citosina en el marcador; G/G: homocigoto para guanina en el marcador.

B. Métodos para determinar la tasa de inducción de haploidía (HIR)

15 La tasa de inducción de haploidía puede determinarse recolectando espigas cruzadas de prueba después de la polinización (por ejemplo, aproximadamente 15 a 20 días después de la polinización). Los embriones de los granos se pueden aislar e incubar en medios apropiados (denominados

20 medios de rescate de embriones) adecuados para mantener la viabilidad de los embriones. En una realización, los medios de rescate usados para la determinación de HIR comprenden 4.43 gramos de medios de referencia de Murashige y Skoog con vitaminas, 30 gramos de sacarosa y 70 mg de ácido salicílico.

25 Los embriones en los medios de rescate pueden colocarse en

condiciones que permitan la expresión del gen indicador de color (por ejemplo, R1-SCM2). En realizaciones de ejemplo, los embriones se colocan bajo una luz de 100-400 micromol durante 16-24 horas a 22-31 °C hasta que algunos de los
5 embriones se vuelven de color púrpura debido a la expresión del gen R1-SCM2. Véase el protocolo, por ejemplo, como se describe en el documento WO2015/104358. Los embriones de color púrpura (diploides) y de color crema (haploides) se pueden contar de cada espiga. La frecuencia de haploides,
10 conocida como tasa de inducción de haploidía, se puede determinar en función del número de haploides sobre el total de embriones.

C. Transformabilidad de la planta

Las plantas de maíz proporcionadas en el presente
15 documento tienen un alto nivel de transformabilidad. La transformabilidad se puede medir en una diversidad de formas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1 a continuación, se puede probar la transformabilidad de los embriones transformando un vector
20 de prueba y detectando el porcentaje de embriones que se transforman con éxito (es decir, la tasa de transformación). Como se usa en el presente documento, la transformación puede referirse a cualquier método de introducción de ADN extraño en un genoma de maíz (por ejemplo, transformación mediada por
25 *Agrobacterium*, bombardeo de partículas, etc.). Los métodos de

ejemplo de transformación de maíz se describen en la Sección IV a continuación. En algunas realizaciones, las plantas de maíz proporcionadas en el presente documento muestran una tasa de transformación de al menos el 2 %, al menos el 5 %, al menos el 8 %, al menos el 10 %, al menos el 12 % o al menos el 15 %. En algunas realizaciones, las plantas de maíz proporcionadas en el presente documento con un alto nivel de transformabilidad tienen un citotipo A normal. En algunas realizaciones, las plantas de maíz proporcionadas en el presente documento con un alto nivel de transformabilidad son al menos heterocigotas (es decir, heterocigotas u homocigotas) para un alelo TF en al menos un TF-QTL (por ejemplo, el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL en el cromosoma 3). En algunas realizaciones, las plantas de maíz son homocigotas para un alelo TF en al menos un TF-QTL (por ejemplo, el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL). En algunas realizaciones, las plantas de maíz que son homocigotas para un alelo TF en un TF-QTL tienen un mayor nivel de transformabilidad que las plantas de maíz que son heterocigotas para el alelo TF en el TF-QTL. En algunas realizaciones, las plantas de maíz proporcionadas en el presente documento con un alto nivel de transformabilidad comprenden tanto un citotipo A normal como un alelo TF en al menos un TF-QTL (por ejemplo, el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL en el cromosoma 3). Las plantas de maíz que comprenden un alelo TF en un TF-QTL pueden identificarse usando cualquier estrategia

de genotipado conocida, incluyendo las descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, las plantas y los métodos descritos en el presente documento comprenden plantas con un
5 citotipo A normal (NA). El citotipo de una planta se puede determinar mediante una diversidad de métodos conocidos. Se puede usar cualquier ensayo que sea capaz de distinguir un citotipo NA de otros citotipos conocidos, incluidos los citotipos B normales (NB) y citoplasmáticos masculinos
10 estériles (CMS). En algunas realizaciones, el ensayo puede comprender uno de los métodos de genotipado descritos en la Sección II.E a continuación. En algunas realizaciones, el ensayo para distinguir un citotipo NA puede desarrollarse basándose en los genomas mitocondriales NA y NB desvelados
15 por Allen, et al., 2007, "Comparisons among two fertile and three male-sterile mitochondrial genomes of maize", Genetics 177: 1173-1192.

En algunas realizaciones, el ensayo para distinguir un citotipo NA de otros citotipos comprende el genotipado de un
20 individuo en uno o más de los marcadores SM2918, SM4813, SM2914 y SM4812. En algunas realizaciones, los genotipos en estos marcadores pueden detectarse usando un ensayo de PCR en tiempo real TaqMan (por ejemplo, de acuerdo con los métodos detallados en la Sección II.E o en el Ejemplo 1 del presente
25 documento). En algunas realizaciones, se usan uno o ambos

marcadores SM2918 y SM4813 para distinguir un citotipo normal (es decir, NA o NB) de un citotipo CMS. En algunas realizaciones, se usan uno o ambos marcadores SM2914 y SM4812 para distinguir un citotipo NA de un citotipo NB. La Tabla 5 enumera los genotipos esperados y los contextos de secuencia en cada uno de estos marcadores, de acuerdo con algunas realizaciones, junto con cebadores y sondas de ejemplo que pueden usarse en ensayos de genotipado de PCR en tiempo real TaqMan.

Tabla 5. Marcadores de ejemplo usados para distinguir individuos de citotipo A normal de citotipo B normal y de citotipo CMS.

Marcador	SM2918	SM4813	SM2914	SM4812
Ubicación	Genoma mitocondrial			
Genotipo del citotipo NA y contexto de secuencia	C/C SEQ ID NO:104	C/C SEQ ID NO:110	C/C SEQ ID NO:116	I/I SEQ ID NO:122
Genotipo del citotipo NB y contexto de secuencia	C/C SEQ ID NO:104	C/C SEQ ID NO:110	A/A SEQ ID NO:117	D/D SEQ ID NO:123
Genotipo del citotipo CMS y contexto	A/A SEQ ID NO:105	A/A SEQ ID NO:111	No aplicable	No aplicable

de secuencia				
Cebador D	SEQ ID NO:100	SEQ ID NO:106	SEQ ID NO:112	SEQ ID NO:118
Cebador I	SEQ ID NO:101	SEQ ID NO:107	SEQ ID NO:113	SEQ ID NO:119
Sondas	SEQ ID NOS: 102-103	SEQ ID NOS: 108-109	SEQ ID NOS: 114-115	SEQ ID NOS: 120- 121

5
10 C/C: homocigoto para citosina en el marcador; A/A: homocigoto para adenina en el marcador; I/I: homocigoto para un alelo de inserción de 6 pb en el marcador; D/D: homocigoto para un alelo de delección de 6 pb en el marcador.

15 En algunas realizaciones, las plantas de maíz desveladas en el presente documento comprenden un alelo TF en al menos un locus de rasgo cuantitativo (QTL) asociado con un aumento de la transformabilidad (TF-QTL). En algunas realizaciones, las plantas de maíz comprenden un alelo TF en qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL, ubicado en el cromosoma 3 entre la posición 14,742,407 y 70,562,070 en el genoma de referencia B73v5.
20 Puede usarse cualquier ensayo que sea capaz de identificar o genotipificar un QTL para identificar las plantas que comprenden el alelo TF en qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el alelo TF en el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL coincide con el de la
25 línea de maíz SYN-INBC34. En algunas realizaciones, las

plantas que comprenden un alelo diferente en el TF-QTL (por ejemplo, el de la línea de maíz RWKS/Z21S//RWKS) son menos susceptibles a la transformación. En algunas realizaciones, el ensayo para identificar el alelo TF en el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL puede comprender uno de los métodos de genotipado descritos en la Sección II.E a continuación. En algunas realizaciones, el ensayo para identificar el alelo TF en el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL puede incluir el genotipado de una planta de maíz en cualquiera de los marcadores descritos en el presente documento (por ejemplo, los descritos en el Ejemplo 1 a continuación y enumerados en la Tabla 6, Tabla 22 y/o Tabla 23). En algunas realizaciones, el ensayo para identificar el alelo TF en el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL puede desarrollarse basándose en cualquier diferencia entre la secuencia del alelo RWKS en el locus (es decir, un alelo TF-QTL no asociado con un aumento de la transformabilidad) y la secuencia del alelo SYN-INBC34 en el locus (es decir, el alelo TF en el TF-QTL).

En algunas realizaciones, el ensayo para identificar el alelo TF en el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL comprende genotipificar un individuo en uno o más de los marcadores SM3158, SM4787, SM3814, SM3362, SM0634AQ y SM4586. En algunas realizaciones, los genotipos en estos marcadores pueden detectarse usando un ensayo de PCR en tiempo real TaqMan (por ejemplo, de acuerdo con los métodos detallados en la Sección II.E o en el Ejemplo

1 del presente documento). La Tabla 6 enumera los genotipos
esperados y los contextos de secuencia en cada uno de estos
marcadores, de acuerdo con algunas realizaciones, junto con
cebadores y sondas de ejemplo que pueden usarse en ensayos de
5 genotipado de PCR en tiempo real TaqMan.

Tabla 6. Marcadores de ejemplo usados para genotipificar
el qCYTO-A TF3.1 TF-QTL.

Marcador	SM3158	SM4787	SM3814	SM3362	SM0634A Q	SM458 6
Ubicación (genoma de referencia B73v5)	Cr 3 147424 07	Cr 3 1921094 2	Cr 3 2871070 8	Cr 3 327506 71	Cr 3 5871931 2	Cr 3 70562 070
Genotipo RWKS y contexto de secuencia	A/A SEQ ID NO:133	A/A SEQ ID NO:139	A/A SEQ ID NO:145	A/A SEQ ID NO:151	C/C SEQ ID NO:157	A/A SEQ ID NO:163

Genotipo	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G
SYN-	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ
INBC34 y	NO:134	NO:140	NO:146	NO:152	NO:158	ID
contexto						NO:16
de						4
secuenci						
a						
Cebador	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ
D	NO:129	NO:135	NO:141	NO:147	NO:153	ID
						NO:15
						9
Cebador	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ
I	NO:130	NO:136	NO:142	NO:148	NO:154	ID
						NO:16
						0
Sondas	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ
	NOS:	NOS:	NOS:	NOS:	NOS:	ID
	131-	137-138	143-144	149-	155-156	NOS:
	132			150		161-
						162

A/A: homocigoto para adenina en el marcador; C/C: homocigoto para citosina en el marcador; G/G: homocigoto para guanina en el marcador.

D. Métodos para determinar la frecuencia de transformación (TF)

La frecuencia de transformación (TF) se puede determinar usando métodos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, una construcción que comprende uno o más genes de interés puede introducirse en una planta, una línea de plantas o una célula vegetal usando métodos descritos en la Sección IV, a continuación. Se calcula el número de plantas que expresan el transgén sobre el número de plantas o partes de plantas (por ejemplo, embriones) que se intentó transformar, lo que equivale a la TF. En algunas realizaciones, el uno o más transgenes de interés comprenden un transgén indicador, cuya expresión da como resultado un fenotipo que puede observarse fácilmente en las plantas. Por lo tanto, la observación del fenotipo en la planta indica una transformación exitosa.

E. Métodos de genotipado

Se puede usar una diversidad de medios para genotipificar un individuo (por ejemplo, una planta) en un sitio polimórfico de interés, tal como un gen (por ejemplo, MATL, DMP), un QTL (por ejemplo, *qhir8*, qCYTO-A_TF3.1 en el QTL del cromosoma 3), o un locus de genoma mitocondrial. En algunas realizaciones, se usa un ensayo de genotipado para determinar si una muestra (por ejemplo, una muestra de ácido nucleico) contiene un alelo variante específico (por ejemplo, mutación o marcador QTL) o haplotipo. Por ejemplo, puede

usarse convenientemente la amplificación enzimática de ácido nucleico de un individuo para obtener ácido nucleico para análisis posteriores. La presencia o ausencia de un alelo variante específico (por ejemplo, mutación o marcador QTL) o haplotipo en uno o más locus de interés también se puede determinar directamente a partir del ácido nucleico del individuo sin amplificación enzimática. En determinadas realizaciones, se genotipifica a un individuo en uno, dos, tres, cuatro, cinco o más sitios polimórficos, tal como un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en uno o más locus de interés. En algunas realizaciones, se genotipifica a un individuo en uno, dos, tres, cuatro, cinco o más sitios polimórficos en uno o más locus de interés en el genoma mitocondrial (por ejemplo, para distinguir individuos de citotipo NA de individuos de otros citotipos).

El genotipado del ácido nucleico de un individuo, amplificado o no, se puede realizar usando cualquiera de diversas técnicas. Las técnicas útiles incluyen, sin limitación, ensayos tales como ensayos de análisis basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ensayos de análisis de secuencias, ensayos de análisis electroforético, ensayos de análisis de polimorfismo de longitud de restricción, ensayos de análisis de hibridación, hibridación específica de alelo, ligadura de oligonucleótidos, elongación/ligadura específica de alelo, amplificación

específica de alelo, extensión de base única, sonda de
inversión molecular, escisión invasiva, terminación
selectiva, polimorfismo de longitud de restricción,
secuenciación, polimorfismo de conformación monocatenario
5 (SSCP, por sus siglas en inglés), polimorfismo monocatenario,
escisión de desajustes y electroforesis en gel de gradiente
desnaturalizante, cada uno de los cuales se puede usar en
solitario o en combinación.

El material que contiene ácido nucleico se obtiene
10 rutinariamente de individuos. Dicho material es cualquier
materia biológica a partir de la cual se pueda preparar un
ácido nucleico. Como ejemplo no limitativo, el material puede
ser partes de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces,
flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos,
15 semillas, esquejes, cultivos celulares o tisulares, o
cualquier otra parte o producto de una planta) o cualquier
tejido vegetal u otra parte de la planta que comprenda ácido
nucleico. En una realización, un método de la presente
divulgación se pone en práctica con una perforación foliar de
20 una plántula, que puede obtenerse fácilmente por medios no
invasivos y usarse para preparar ADN genómico y/o
mitocondrial. En otra realización, el genotipado implica la
amplificación del ácido nucleico de un individuo usando la
reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

25 Se puede usar cualquiera de una diversidad de cebadores

diferentes para amplificar el ácido nucleico de un individuo mediante PCR para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante (por ejemplo, mutación o marcador QTL) en una planta o método de la presente divulgación. Como entenderá un experto en la materia, los cebadores para el análisis de PCR se pueden diseñar basándose en la secuencia que flanquea el uno o más sitios polimórficos de interés en el gen de interés. Como ejemplo no limitativo, un cebador de secuencia puede contener de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de una secuencia cadena arriba o cadena abajo del sitio polimórfico de interés en el gen o locus de interés. Dichos cebadores generalmente están diseñados para tener suficiente contenido de guanina y citosina para alcanzar una temperatura de fusión alta que permita una etapa de hibridación estable en la reacción de amplificación. Están disponibles varios programas informáticos, tal como Primer Select, para facilitar el diseño de cebadores de PCR.

Un ensayo de discriminación alélica (por ejemplo, un ensayo TaqMan® disponible en Applied Biosystems) puede ser útil para genotipificar un individuo en un sitio polimórfico para determinar así la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación o marcador QTL) o haplotipo en el gen o locus de interés. En un ensayo de discriminación alélica TaqMan®, se construye una sonda marcada con colorante fluorescente específica para cada

alelo. Las sondas contienen diferentes colorantes indicadores fluorescentes tales como FAM y TET para diferenciar la amplificación de cada alelo. Además, cada sonda tiene un colorante inhibidor en un extremo que inhibe la fluorescencia mediante la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Durante la PCR, cada sonda se hibrida específicamente con secuencias complementarias en el ácido nucleico del individuo. La actividad de nucleasa 5' de la polimerasa Taq se usa para escindir solo la sonda que se hibrida con el alelo. La escisión separa el colorante indicador del colorante inhibidor, dando como resultado un aumento de la fluorescencia del colorante indicador. Por lo tanto, la señal de fluorescencia generada por la amplificación por PCR indica qué alelos están presentes en la muestra. Los desajustes entre una sonda y un alelo reducen la eficacia tanto de la hibridación como de la escisión de la sonda por la polimerasa Taq, lo que da como resultado una señal fluorescente escasa o nula. Los expertos en la materia entienden que se puede lograr una especificidad mejorada en los ensayos de discriminación alélica conjugando un grupo de unión al surco menor (MGB) de ADN con una sonda de ADN como se describe, por ejemplo, en Kutuyavin et al., Nuc. Acids Research 28:655-661 (2000). Las uniones al surco menor incluyen, pero sin limitación, compuestos tales como tripéptido de dihidrociclopirroloindol (DPI3).

El análisis de secuencias también puede ser útil para genotipificar un individuo de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación o marcador QTL) o haplotipo en el gen o locus de interés. Como saben los expertos en la materia, un alelo variante de interés puede detectarse mediante análisis de secuencias usando los cebadores apropiados, que se diseñan basándose en la secuencia que flanquea el sitio polimórfico de interés en el gen o locus de interés. Por ejemplo, un alelo variante en un gen o locus de interés puede detectarse mediante análisis de secuencias usando cebadores diseñados por un experto en la materia. Los cebadores de secuencia adicionales o alternativos pueden contener de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de una secuencia que corresponde a una secuencia de aproximadamente 40 a aproximadamente 400 pares de bases cadena arriba o cadena abajo del sitio polimórfico de interés en el gen o locus de interés. Dichos cebadores generalmente se diseñan para tener suficiente contenido de guanina y citosina para alcanzar una temperatura de fusión alta que permita una etapa de hibridación estable en la reacción de secuenciación. Como se usa en el presente documento, la expresión "análisis de secuencias" incluye cualquier proceso manual o automatizado mediante el cual se determina el orden de los nucleótidos en

un ácido nucleico y abarca, sin limitación, métodos químicos y enzimáticos.

El análisis electroforético también puede ser útil en el genotipado de un individuo de acuerdo con los métodos de la presente divulgación para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación o marcador QTL) o haplotipo en el gen o locus de interés. Como se usa en el presente documento, "análisis electroforético" en referencia a uno o más ácidos nucleicos tales como fragmentos amplificados, incluye un proceso mediante el cual las moléculas cargadas se mueven a través de un medio estacionario bajo la influencia de un campo eléctrico. Los métodos de análisis electroforético y variaciones de los mismos se conocen bien en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology Capítulo 2 (Suplemento 45) John Wiley & Sons, Inc. Nueva York (1999).

El análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) también puede ser útil para genotipificar un individuo de acuerdo con los métodos de la presente divulgación para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación o marcador QTL) o haplotipo en el gen o locus de interés (véanse, Jarcho et al. en Dracopoli et al., Current Protocols in Human Genetics pages 2.7.1-2.7.5, John Wiley & Sons, Nueva York;

Innis et al., (Ed.), PCR Protocols, San Diego: Academic Press, Inc. (1990)). El análisis RFLP se puede realizar en productos de amplificación por PCR.

Además, la hibridación de oligonucleótidos específica de alelo puede ser útil para genotipificar un individuo en las plantas o los métodos descritos en el presente documento para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación o marcador QTL) o haplotipo en el gen o locus de interés. La hibridación de oligonucleótidos específica de alelo se basa en el uso de una sonda de oligonucleótidos marcada que tiene una secuencia perfectamente complementaria, por ejemplo, con la secuencia que abarca el alelo variante. En condiciones apropiadas, la sonda específica de alelo variante se hibrida con un ácido nucleico que contiene el alelo variante pero no se hibrida con uno o más alelos que tienen uno o más desajustes de nucleótidos en comparación con la sonda. Si se desea, también se puede usar una segunda sonda de oligonucleótidos específica de alelo que coincida con un alelo alternativo (por ejemplo, de tipo silvestre). De manera similar, la técnica de amplificación de oligonucleótidos específica de alelo se puede usar para amplificar selectivamente, por ejemplo, un alelo variante usando un cebador de oligonucleótidos específico de alelo que es perfectamente complementario a la secuencia de nucleótidos del alelo

variante pero que tiene uno o más desajustes en comparación con otros alelos (Mullis et al., anteriormente). Un experto en la materia entiende que uno o más desajustes de nucleótidos que distinguen entre el alelo variante y otros alelos a menudo se ubican en el centro de un cebador de oligonucleótidos específico de alelo que se usará en la hibridación de oligonucleótidos específica de alelo. Por el contrario, un cebador de oligonucleótidos específico de alelo que se usará en la amplificación por PCR generalmente contiene uno o más desajustes de nucleótidos que distinguen entre el alelo variante y otros alelos en el extremo 3' del cebador.

Un ensayo de movilidad heterodúplex (HMA, por sus siglas en inglés) es otro ensayo bien conocido que se puede usar para el genotipado en las plantas o métodos de la presente divulgación para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación o marcador QTL) o haplotipo en el gen o locus de interés. El HMA es útil para detectar la presencia de un alelo variante, ya que un dúplex de ADN que tiene un desajuste tiene una movilidad reducida en un gel de poliacrilamida en comparación con la movilidad de un dúplex con pares de bases perfectos (véanse, Delwart et al., *Science*, 262:1257-1261 (1993); White et al., *Genomics*, 12:301-306 (1992)).

La técnica del polimorfismo conformacional monocatenario

(SSCP) también puede ser útil para el genotipado en las plantas o los métodos descritos en el presente documento para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación o marcador QTL) o haplotipo en el gen o locus de interés (véase, Hayashi, Methods Applic., 1:34-38 (1991)). Esta técnica se usa para detectar alelos variantes en función de las diferencias en la estructura secundaria del ADN monocatenario que producen una movilidad electroforética alterada en la electroforesis en gel no desnaturizante. Los alelos variantes se detectan mediante la comparación del patrón electroforético del fragmento de prueba con los fragmentos estándar correspondientes que contienen alelos conocidos.

La electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés) también puede ser útil en las plantas o métodos de la presente divulgación para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación o marcador QTL) o haplotipo en el gen o locus de interés. En la DGGE, el ADN bicatenario se somete a electroforesis en un gel que contiene una concentración creciente de desnaturizante; los fragmentos bicatenarios constituidos por alelos desajustados tienen segmentos que se disuelven más rápidamente, lo que hace que dichos fragmentos migren de manera diferente en comparación con las secuencias perfectamente complementarias (véase,

Sheffield et al., "Identifying DNA Polymorphisms by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis" en Innis et al., anteriormente, 1990).

5 Se conocen en la materia otros métodos moleculares útiles para genotipificar un individuo y son útiles en las plantas o métodos de la presente divulgación. Dichos enfoques de genotipificación bien conocidos incluyen, sin limitación, secuenciación automatizada y técnicas de desajuste de RNasa (véase, Winter et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 82:7575-7579
10 (1985)). Además, un experto en la materia entiende que, cuando se va a determinar la presencia o ausencia de alelos variantes múltiples, los alelos variantes individuales pueden detectarse mediante cualquier combinación de métodos moleculares. Véase, en general, Birren et al. (Eds.) Genome
15 Analysis: A Laboratory Manual Volumen 1 (Analyzing DNA) Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997). Además, un experto en la materia entiende que se pueden detectar múltiples alelos variantes en reacciones individuales o en una única reacción (un ensayo "múltiplex").

20 **F. Enzimas de modificación de ADN**

En algunas realizaciones, las plantas de maíz HI-NA de la presente divulgación son capaces de expresar una enzima de modificación de ADN. En algunas realizaciones, dichas plantas son también capaces de expresar opcionalmente al menos un
25 ácido nucleico guía (por ejemplo, ARN guía). En algunas

realizaciones, la modificación de ADN es una nucleasa dirigida seleccionada del grupo que consiste en nucleasa Cas9, nucleasa Cas12a, meganucleasas (MN), nucleasas con dedos de cinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), dCas9-FokI, dCas12a-FokI, Cas9-citidina desaminasa quimérica, Cas9-adenina desaminasa quimérica, FEN1-FokI quimérica, MegaTAL, una nickasa Cas9 (nCas9), nucleasa dCas9 no FokI quimérica, nucleasa dCas12a no FokI, Cas12a-citidina desaminasa quimérica y Cas12a-adenina desaminasa. Los métodos para obtener dichas plantas se describen con más detalle en la Sección III a continuación.

G. Grupos heteróticos de plantas

Ventajosamente, las plantas de maíz de la presente divulgación, incluidas las plantas HI y las plantas NA usadas en los mejoramientos para producir las plantas HI-NA analizadas en el presente documento, pueden obtenerse de cualquier grupo heterótico conocido. Además de la introgresión de rasgos, un objetivo del fitomejoramiento es realizar mejoras genéticas en líneas varietales y también en líneas precursoras de híbridos. Un programa eficaz de mejoramiento de híbridos realiza mejoras genéticas en las líneas precursoras tanto en el grupo heterótico de progenitores femeninos del híbrido como en el grupo heterótico de progenitores masculinos del híbrido. Por lo

tanto, es ventajoso realizar mejoras genéticas en todos los grupos heteróticos usados en un programa de mejoramiento. La Tabla 7 muestra los grupos heteróticos comunes a los que pertenecen diversos germoplasmas. Las plantas HI-NA también se pueden usar para cruzar con una planta de maíz de cualquier grupo heterótico para editar su genoma y mejorar sus rasgos. En algunas realizaciones, las plantas de maíz de la presente divulgación pertenecen a cualquiera de los grupos heteróticos de la Tabla 7. En algunas realizaciones, la planta de maíz comprende un germoplasma *Stiff Stalk*, un germoplasma *Non-Stiff Stalk*, un germoplasma *Non-Stiff Stalk Iodent*, un germoplasma tropical o un germoplasma subtropical. En otras realizaciones, la planta de maíz comprende un germoplasma clasificado en cualquier otro grupo heterótico conocido por un experto en la materia (véanse, por ejemplo, L. Reid, et al., 2011, "Genetic diversity analysis of 119 Canadian maize inbred lines based on pedigree and simple sequence repeat markers", Can. J. Plant Sci. 91: 651-661 y M. Mikel y J. Dudley, 2006, "Evolution of North American Dent Corn from Public to Proprietary Germplasm", Crop Sci. 46: 1193-1205, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Las plantas de maíz de la presente divulgación también pueden obtenerse de cualquier línea patentada o conocida públicamente. En algunas realizaciones, la planta de maíz se obtiene de cualquiera de

las líneas Stock 6, RWK, RWS, UH400, AX5707RS y/o NP2222. En otras realizaciones, la planta de maíz se obtiene de cualquier otra línea de interés.

Tabla 7. Grupos heteróticos y líneas de germoplasma de ejemplo.

Grupo heterótico	Líneas de germoplasma
<i>Non-Stiff Stalk</i>	SYN-INBE56, SYN-INBB23
<i>Stiff Stalk</i>	NP2222, SYN-INBF67, SYN-INBC34
<i>Non-Stiff Stalk Iodent</i>	SYN-INBD45, SYN-INBG78, SYN-INBH89, SYN-INBI90
De tipo Mo17 <i>Non-Stiff Stalk</i>	SYN-INBJ13
Tropical	SYN-INBK14

III. Producción de plantas HI-NA

En otro aspecto, el presente documento proporciona métodos para producir plantas de maíz inductoras de haploidía transformables (plantas HI-NA). En algunas realizaciones, la producción de plantas HI-NA implica cruzar una línea vegetal HI (que posee una combinación de alelos HI en cualquiera de los genes o HI-QTL como se ha descrito anteriormente) como donante de polen con una línea vegetal NA como receptora. En algunas realizaciones, la línea vegetal receptora también comprende un alelo TF en uno o más TF-QTL como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la línea vegetal receptora comprende un alelo TF en el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL en

el cromosoma 3. En algunas realizaciones, la línea vegetal donante de polen y/o la línea vegetal receptora presentan una alta carga de polen y/o de peso de la borla. En algunas realizaciones, los alelos de tipo silvestre se modifican para formar los alelos HI correspondientes en uno o más genes y/o HI-QTL. En algunas realizaciones, la maquinaria de edición génica para editar todos los alelos HI y HI-QTL se suministra en la misma planta diana, por ejemplo, a través de un proceso de cotransformación. En algunas realizaciones, la edición de los alelos HI-QTL/HI se produce secuencialmente. Por ejemplo, la maquinaria de edición génica para editar el alelo de tipo silvestre para producir el primer alelo HI (por ejemplo, en el *ghir8* QTL) puede suministrar primero, y se seleccionan las plantas que comprenden el primer alelo HI. Posteriormente, la maquinaria de edición génica dirigida al segundo alelo HI (por ejemplo, en el gen MATL) se introduce en la misma planta o en generaciones posteriores de la misma planta que ya comprenden el primer alelo HI, y así sucesivamente. En algunas realizaciones, se editan simultáneamente dos o más alelos HI-QTL/HI, seguido de la edición de alelos HI-QTL/HI adicionales. Diversas alternativas de los esquemas de transformación mencionados anteriormente también se contemplan y abarcan en esta divulgación. Se desvelan realizaciones de ejemplo de la producción de plantas HI en la Patente de EE.UU. N.º 10,285,348, cuya divulgación en su

totalidad se incorpora en el presente documento por referencia.

A. Estrategias de mejoramiento

Se pueden usar diversos métodos para producir las plantas HI-NA en la presente divulgación. En la **figura 1** se ilustra una realización de ejemplo de los métodos. En algunas realizaciones, las plantas HI pueden servir como progenitor donante de polen (progenitor masculino) y cruzarse con las plantas NA como progenitor femenino para generar plantas F1.

En algunas realizaciones, el progenitor donante de polen es homocigoto para una mutación de pérdida de función en el gen MATL y es al menos heterocigoto (por ejemplo, heterocigoto u homocigoto) para un alelo HI en un segundo locus. En algunas realizaciones, el alelo HI comprende un alelo HI en *ghir8* HI-QTL.

En algunas realizaciones, el alelo HI comprende una mutación de pérdida de función en el gen DMP dentro del *ghir8* HI-QTL. En algunas realizaciones, el progenitor donante de polen es resistente a la transformación. En algunas realizaciones, la planta de maíz del progenitor femenino es al menos heterocigota (por ejemplo, heterocigota u homocigota) para un alelo TF en un tercer locus (por ejemplo, en un TF-QTL). En algunas realizaciones, el progenitor femenino es al menos heterocigota para un alelo TF en el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL en el cromosoma 3. En algunas realizaciones, el polen del progenitor donante de polen se

usa para polinizar la planta de maíz del progenitor femenino.

En algunas realizaciones, todas las plantas de la progenie F1 de los cruces descritos anteriormente tendrán el citoplasma NA debido a la herencia citoplasmática materna. En
5 algunas realizaciones, las plantas de la progenie F1 serán al menos heterocigotas para un alelo TF. En algunas realizaciones, la planta HI donante de polen lleva un alelo para un marcador seleccionable, como se ha descrito anteriormente, para permitir la diferenciación entre los
10 embriones de la progenie haploide y diploide. En algunas realizaciones, la planta HI donante de polen es homocigota para el marcador seleccionable. En algunas realizaciones, el marcador seleccionable puede incluir uno cualquiera de GUS, PMI, PAT, GFP, RFP, CFP, B1, CI, NPTII, HPT, ACC3, AADA, alto
15 contenido de aceite, R-navajo (R-nj), R1-scutellum (R1-SCM2) y/o un pigmento de antocianina. En algunas realizaciones, el marcador seleccionable es el alelo R1-SCM2 en el locus R1 en el cromosoma 10. En algunas realizaciones, la planta HI donante de polen que comprende el alelo R1-SCM2 también es al
20 menos heterocigota para un alelo de tipo silvestre en el locus inhibidor de color en el cromosoma 9, como se ha descrito anteriormente. Los embriones diploides que son heterocigotos u homocigotos para el alelo R1-SCM2 presentarán un color púrpura, mientras que los embriones haploides que no
25 tienen el alelo R1-SCM2 presentarán un color crema. Dado que

el gen indicador de color proviene del mismo progenitor que los alelos HI, el color de un embrión puede indicar si porta los alelos HI. En algunas realizaciones, un embrión de color púrpura es diploide.

5 En algunas realizaciones, las plantas F1 diploides se seleccionan y se autopolinizan para producir embriones para la generación F2. En otras realizaciones, las plantas diploides F1 se retrocruzan con la línea vegetal precursora NA para producir la generación BC1. En algunas realizaciones, 10 las plantas F1 diploides se identifican usando el marcador seleccionable. En algunas realizaciones, las que tienen el producto marcador seleccionable (por ejemplo, las que tienen un color púrpura en el caso del alelo R1-SCM2) también portan los alelos HI. Las plantas F2 y las plantas BC1 pueden 15 genotipificarse para confirmar la presencia de los alelos HI usando métodos como los descritos anteriormente. En algunas realizaciones, las plantas F2 y/o BC1 que son homocigotas o heterocigotas para los alelos HI como se ha descrito anteriormente se seleccionan para mejoramiento adicional. En 20 algunas realizaciones, las plantas de la progenie F2 y/o BC1 se seleccionan para plantas de citotipo NA que son homocigotas para la mutación de pérdida de función en el gen MATL y al menos heterocigotas para el alelo HI adicional (por ejemplo, en el *qhir8* HI-QTL). En algunas realizaciones, las 25 plantas de la progenie F2 y/o BC1 se seleccionan para plantas

que son al menos heterocigotas para un alelo TF (por ejemplo, en el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL en el cromosoma 3).

En algunas realizaciones, las plantas F2 seleccionadas se autopolinizan para producir plantas F3. En algunas realizaciones, las plantas BC1 seleccionadas se autopolinizan para generar plantas BC1F2. Las plantas F3 y/o las plantas BC1F2 pueden genotipificarse para determinar la presencia de los alelos HI, los alelos TF y/o el marcador seleccionable. En algunas realizaciones, estas plantas también se ensayan para la HIR usando métodos descritos en el presente documento. Se pueden seleccionar plantas F3 y/o plantas BC1F2 adecuadas para mejoramiento adicional si son al menos heterocigotas para la combinación de alelos HI deseada y también tienen una HIR de al menos el 5 %, al menos el 6 %, al menos el 7 % o al menos el 10 %.

Las plantas F3 y/o las plantas BC1F2 seleccionadas pueden autopolinizarse para generar las plantas F4 y/o las plantas BC1F3 de manera similar. En algunas realizaciones, se determinan la HIR y la frecuencia de transformación (TF) de estas plantas. En algunas realizaciones, las plantas que presentan una HIR suficientemente alta, por ejemplo, al menos 10 %, al menos el 12 %, o al menos el 15 %, y también una alta TF, por ejemplo, al menos el 2 %, al menos el 5 %, al menos el 7 %, al menos el 9 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 40 %, al menos el 50 % o al menos el 60 %

se seleccionan como las plantas HI-NA.

En algunas realizaciones, las plantas F4 y/o las plantas BC1F3 que presentan una HIR suficientemente alta se reproducen adicionalmente a través de la autopolinización para producir generaciones adicionales de plantas, por ejemplo, F5, F6, F7, BC1F4, BC1F5, BC1F6. Estas plantas pueden ensayarse para confirmar que tienen la tasa de HIR y TF deseada.

También se contemplan en el presente documento realizaciones adicionales de las estrategias de mejoramiento descritas anteriormente. Por ejemplo, las plantas BC1 descritas anteriormente pueden retrocruzarse con la línea precursora NA para generar plantas BC2. En algunas realizaciones, cada generación se retrocruza repetidamente con una línea precursora (por ejemplo, para generar plantas BC3, plantas BC4, plantas BC5, etc.). En algunas realizaciones, los cruces de autopolinización se realizan después de una o más generaciones de retrocruzamiento (por ejemplo, para generar plantas BC2F2, plantas BC2F3, plantas BC3F2, plantas BC2F3, etc.). En algunas realizaciones, uno o más del genotipado para alelos HI, genotipado para alelos TF, fenotipado para HIR y/o TF, etc., pueden realizarse en cada generación.

En algunas realizaciones, el progenitor masculino y/o el progenitor femenino de los métodos descritos anteriormente

pertenecen a cualquiera de los grupos heteróticos de la Tabla 7. En algunas realizaciones, el progenitor masculino pertenece a un grupo heterótico diferente al de la progenitora femenina. En algunas realizaciones, el progenitor masculino y/o el progenitor femenino comprenden un germoplasma *Stiff Stalk*, un germoplasma *Non-Stiff Stalk*, un germoplasma *Non-Stiff Stalk Iodent*, un germoplasma tropical o un germoplasma subtropical. En otras realizaciones, el progenitor masculino y/o el progenitor femenino comprenden un germoplasma clasificado en cualquier otro grupo heterótico conocido por un experto en la materia (véanse, por ejemplo, L. Reid, et al., 2011, "Genetic diversity analysis of 119 Canadian maize inbred lines based on pedigree and simple sequence repeat markers", Can. J. Plant Sci. 91: 651-661 y M. Mikel y J. Dudley, 2006, "Evolution of North American Dent Corn from Public to Proprietary Germplasm", Crop Sci. 46: 1193-1205, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). El progenitor masculino y/o el progenitor femenino también pueden obtenerse de cualquier línea patentada o conocida públicamente. En algunas realizaciones, el progenitor masculino y/o el progenitor femenino se obtiene de cualquiera de las líneas Stock 6, RWK, RWS, UH400, AX5707RS y/o NP2222.

B. Mejoramiento y direccionamiento mutacional

En otro aspecto, los métodos para producir las plantas

de maíz inductoras de haploidía transformables descritas en el presente documento comprenden una combinación de introgresión de rasgos a través de mejoramiento y direccionamiento mutacional directo de genes. En algunas realizaciones, los alelos de tipo silvestre se modifican para formar alelos HI. En algunas realizaciones, se usa el direccionamiento mutacional de los genes *MATL* y/o *DMP* para producir alelos HI (por ejemplo, mutaciones de pérdida de función *matl* y/o *dmp*). En algunas realizaciones, el direccionamiento mutacional se logra a través de la edición génica. En algunas realizaciones, la maquinaria de edición génica para editar todos los alelos HI se suministra en la misma planta diana, por ejemplo, mediante multiplexación de ARN guía o mediante un proceso de cotransformación. En algunas realizaciones, la edición de los alelos HI se produce secuencialmente. Por ejemplo, la maquinaria de edición génica para editar el alelo de tipo silvestre para producir el primer alelo HI (por ejemplo, una mutación de pérdida de función en *DMP*) puede suministrar primero, y se seleccionan las plantas que expresan de manera estable el primer alelo HI. Posteriormente, la maquinaria de edición génica dirigida al segundo alelo HI (por ejemplo, una mutación de pérdida de función en *MATL*) se introduce en la misma planta o en generaciones posteriores de la misma planta que ya expresa el primer alelo HI, y así sucesivamente. En algunas

realizaciones, se editan simultáneamente dos o más alelos HI seguido de la edición de alelos HI adicionales. Diversas alternativas de los esquemas de transformación mencionados anteriormente también se contemplan y abarcan en esta divulgación. Se desvelan realizaciones de ejemplo de la producción de plantas HI en la Patente de EE.UU. N.º 10,285,348, cuya divulgación en su totalidad se incorpora en el presente documento por referencia.

En algunas realizaciones, una planta de maíz que comprende alelos de tipo silvestre de los genes MATL y DMP se usa como donante de polen (es decir, la planta progenitora masculina) en un cruce con otra planta de maíz (es decir, la planta progenitora femenina). En algunas realizaciones, la planta progenitora femenina comprende un citoplasma NA. En algunas realizaciones, la planta progenitora femenina es al menos heterocigota (por ejemplo, heterocigota u homocigota) para un alelo TF en un TF-QTL (por ejemplo, en el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL en el cromosoma 3). En algunas realizaciones, la planta donante de polen lleva un alelo de gen marcador seleccionable, como se ha descrito anteriormente, para permitir la diferenciación entre los embriones de progeñie haploide y diploide. En algunas realizaciones, la planta donante de polen es al menos heterocigota para el alelo del gen marcador seleccionable. En algunas realizaciones, el alelo del gen marcador seleccionable puede incluir uno

cualquiera de GUS, PMI, PAT, GFP, RFP, CFP, B1, CI, NPTII, HPT, ACC3, AADA, alto contenido de aceite, R-navajo (R-nj), R1-scutellum (R1-SCM2) y/o un pigmento de antocianina. En algunas realizaciones, el alelo del gen marcador seleccionable es el alelo R1-SCM2 en el locus R1 en el cromosoma 10. En algunas realizaciones, la planta donante de polen que comprende el alelo R1-SCM2 también es al menos heterocigota para un alelo de tipo silvestre en el locus inhibidor de color en el cromosoma 9, como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, las plantas F1 se autopolinizan para producir embriones para la generación F2. En otras realizaciones, las plantas F1 se retrocruzan con la línea vegetal precursora femenina o masculina para producir la generación BC1. Las plantas F2 y/o las plantas BC1 pueden seleccionarse por la presencia de un citoplasma NA, el alelo TF en el TF-QTL, el alelo del gen marcador seleccionable y/o el alelo de tipo silvestre en el locus inhibidor de color en el cromosoma 9 usando métodos de genotipado como se ha descrito anteriormente. Las plantas F2 y/o BC1 seleccionadas pueden autopolinizarse y/o retrocruzarse durante una o varias generaciones más, como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, las plantas F2 y/o BC1 seleccionadas, o la progenie de las mismas, se editan, como se ha descrito anteriormente y en la Sección V a continuación, para provocar

una mutación de pérdida de función en el gen MATL y/o el gen DMP para obtener una planta inductora de haploidía transformable. En algunas realizaciones, la planta inductora de haploidía transformable se autopoliniza y/o se retrocruza durante una o varias generaciones. La planta inductora de haploidía transformable, o la progenie de la misma, se puede genotipificar y/o fenotipar como se ha descrito anteriormente para seleccionar una planta que tenga alta transformabilidad y alta inducción de haploidía.

En algunas realizaciones, el progenitor masculino y/o el progenitor femenino de los métodos descritos anteriormente pertenecen a cualquiera de los grupos heteróticos de la Tabla 7. En algunas realizaciones, el progenitor masculino pertenece a un grupo heterótico diferente al de la progenitora femenina. En algunas realizaciones, el progenitor masculino y/o el progenitor femenino comprenden un germoplasma *Stiff Stalk*, un germoplasma *Non-Stiff Stalk*, un germoplasma *Non-Stiff Stalk Iodent*, un germoplasma tropical o un germoplasma subtropical. En otras realizaciones, el progenitor masculino y/o el progenitor femenino comprenden un germoplasma clasificado en cualquier otro grupo heterótico conocido por un experto en la materia (véanse, por ejemplo, L. Reid, et al., 2011, "Genetic diversity analysis of 119 Canadian maize inbred lines based on pedigree and simple sequence repeat markers", Can. J. Plant Sci. 91: 651-661 y M.

Mikel y J. Dudley, 2006, "Evolution of North American Dent Corn from Public to Proprietary Germplasm", Crop Sci. 46: 1193-1205, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). El progenitor masculino y/o el progenitor femenino también pueden obtenerse de cualquier línea patentada o conocida públicamente. En algunas realizaciones, el progenitor masculino y/o el progenitor femenino se obtiene de cualquiera de las líneas Stock 6, RWK, RWS, UH400, AX5707RS y/o NP2222.

10 **IV. Transformación de plantas de maíz HI-NA**

En otro aspecto, el presente documento proporciona métodos para transformar una planta HI-NA descrita anteriormente. En algunas realizaciones, un gen de interés (por ejemplo, un gen que codifica una enzima de modificación de ADN como se ha desvelado anteriormente y uno o más ARN guía) se puede introducir en las plantas de maíz HI-NA descritas anteriormente. Los métodos adecuados para la transformación de plantas son la transformación de protoplastos mediante la captación de ADN inducida por polietilenglicol, el proceso biolístico que usa la pistola de genes: el método de "bombardeo de partículas", la transformación mediada por péptidos de penetración celular (CPP, del inglés *cell-penetrating peptide*), la transformación mediada por glicol, la electroporación, la microinyección y transferencia génica, descrita anteriormente, mediada por

Agrobacterium. Los procesos mencionados se describen, por ejemplo, en B. Jené et al., *Techniques for Gene Transfer*, en: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, editado por S. D. Kung y R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 y en Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225).

En una realización, el gen de interés se clona en un vector que es adecuado para ser transformado en *Agrobacterium tumefaciens*. Las *Agrobacteria* transformadas usando un vector de este tipo se pueden usar entonces de manera conocida para la transformación de plantas, en particular de plantas de cultivo, por ejemplo, bañando hojas heridas o trozos de hojas en una solución de *Agrobacteria* y cultivándolas posteriormente en medios adecuados.

En algunas realizaciones, uno o más genes que se sabe que tienen la capacidad de aumentar la transformabilidad se cotransforman con el gen de interés en la planta HI-NA. Estos genes se denominan factores morfogénicos o genes de refuerzo en la presente solicitud. Las clases de factores morfogénicos incluyen BABY BOOM (BBM), similar a BBM, EMBRYOMAKER (EMK), AINTEGUMENTA (ANT), SIMILAR A AINTEGUMENTA (AIL), PLETHORA (PLT), WUSCHEL (WUS) u homeobox WUS (Wox), GRF (Factor Regulador del Crecimiento), BROTE SIN MERISTEMO (STM), similar a AGAMOUS (AGL), MYB115, MYB118, cinasa similar al receptor de la embriogénesis somática (SERK), FACTOR

RELACIONADO CON LA EMBIOGÉNESIS SOMÁTICA (SERF) y Motivo AT-HOOK QUE CONTIENE LA PROTEÍNA NUCLEAR LOCALIZADA (AHL). Los ejemplos no limitantes de los genes de refuerzo incluyen PÉPTIDO DE DESARROLLO DE ÓVULO (ODP, por sus siglas en inglés), BABY BOOM (BBM), WUSCHEL2 (WUS2), HOMEODOMAIN 5 RELACIONADO CON WUSCHEL (WOX5, por sus siglas en inglés), FACTOR 5 REGULADOR DEL CRECIMIENTO (GRF5, por sus siglas en inglés), o una proteína quimérica que combina el FACTOR 4 REGULADOR DEL CRECIMIENTO (GRF4, por sus siglas en inglés) y su cofactor FACTOR 1 DE INTERACCIÓN CON GRF (GIF1, por sus siglas en inglés). Se conocen métodos para realizar la cotransformación del gen de refuerzo con un gen de interés para impulsar la eficacia de la transformación, por ejemplo, como se desvela en Lowe et al. (2016) "Morphogenic Regulators Baby boom and Wuschel Improve Monocot Transformation", *Plant Cell* 28, 1998-2015; Hoerster, et al. (2020) "Use of non-integrating ZmWus2 vectors to enhance maize transformation", *In Vitro Cellular & Developmental Biology*; Mookkan et al., (2017) "Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators BABY BOOM and WUSCHEL2", *Plant Cell Reports* 36:1477-1491; Kong et al. (2020) "Overexpression of Transcription Factor Growth Regulating Factor5 Improves Transformation of Monocot and Dicot Species", *Front. in Plant Sci*, 10.3389/fpls.2020.572319), o utilizando GRF4-GIF1 como

se describe en Debernardi, J.M. et al. (2020), "A *GRF-GIF* chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants", *Nature Biotechnology* 38: 1274-1279. Todo el contenido de las referencias mencionadas anteriormente se incorpora en el presente documento por referencia. Véase también la Pat. de EE.UU. N.º 7,151,170; la Pat. de EE.UU. N.º 7,579,529; la Pat. de EE.UU. N.º 7,256,322; la Pat. de EE.UU. N.º 7,700,829; el documento WO 2018/224001; el documento WO 2018/098420; y el documento PCT/US2020/45573; cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, un gen de refuerzo usado en la cotransformación reside en un vector diferente del gen de interés. En algunas realizaciones, el gen de refuerzo está en el mismo vector que el gen de interés. Los Ejemplos 2 y 7 a continuación muestran realizaciones de ejemplo ilustrativas de la cotransformación de uno o más genes de refuerzo con el gen de interés en las plantas HI-NA desveladas en el presente documento.

V. Edición génica de plantas diana

Diversas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento usan la edición génica. En algunas realizaciones, la edición génica se usa para mutagenizar el genoma de una planta para producir plantas que tengan uno o más alelos HI (por ejemplo, un alelo HI de un gen y/o un

alelo HI en un HI-QTL) y/o uno o más alelos TF (por ejemplo, en un TF-QTL).

En algunas realizaciones, el presente documento proporciona plantas HI-NA transformadas con y que expresan maquinaria de edición génica como se ha descrito anteriormente, que, cuando se cruzan con una planta diana, dan como resultado la edición génica en la planta diana.

En general, la edición génica puede implicar la expresión transitoria, inducible o constitutiva de los componentes o sistemas de edición génica. La edición génica puede implicar la integración genómica o la presencia episómica de los componentes o sistemas de edición génica.

La edición génica se refiere generalmente al uso de una nucleasa dirigida (incluyendo, pero sin limitación, CRISPR/Cas, dedos de cinc, meganucleasas y similares) para cortar una secuencia de nucleótidos en una ubicación deseada. Esto puede ser para provocar una mutación de inserción/delección ("indel"), (es decir, "SDN1"), una edición de base (es decir, "SDN2") o la inserción o reemplazo de alelos (es decir, "SDN3"). La edición génica de SDN2 o SDN3 puede comprender proporcionar uno o más moldes de recombinación (por ejemplo, en un vector) que comprenden una secuencia génica de interés que se puede usar para la reparación dirigida por homología (HDR, por sus siglas en inglés) dentro de la planta (es decir, que se va a introducir

en el genoma de la planta). En algunas realizaciones, el gen de interés puede ser un alelo HI (por ejemplo, *mat1* o *dmp*) que se va a introducir en el genoma de una planta para generar una planta HI o una planta HI-NA. En algunas

5 realizaciones, el gen o alelo de interés es uno que puede conferir a la planta un rasgo mejorado, por ejemplo, rendimiento mejorado. El molde de recombinación se puede introducir en la planta a editar, ya sea a través de transformación o a través del mejoramiento con una planta

10 donante que comprenda el molde de recombinación. Las rupturas en el genoma de la planta pueden introducirse dentro, cadena arriba y/o cadena abajo con respecto a una secuencia diana. En algunas realizaciones, se produce una rotura de ADN bicatenario dentro o cerca del locus de la secuencia diana.

15 En algunas realizaciones, se producen roturas cadena arriba y cadena abajo del locus de la secuencia diana, lo que puede conducir a su escisión del genoma. En algunas realizaciones, se producen una o más roturas de ADN monocatenario (mellas) dentro, cadena arriba y/o cadena abajo de la secuencia diana

20 (por ejemplo, usando una variante de la nickasa Cas9). Cualquiera de estas roturas de ADN, así como las introducidas a través de otros métodos conocidos por un experto en la materia, pueden inducir HDR. A través de HDR, la secuencia diana se reemplaza por la secuencia del molde de

25 recombinación proporcionado. En determinadas realizaciones,

una secuencia génica de interés como se describe en el presente documento (por ejemplo, las secuencias de los alelos *matl* o *dmp*) puede proporcionarse en/como un molde. Mediante el diseño del sistema de forma que se introduzcan una o más roturas monocatenarias o bicatenarias, cadena arriba y/o cadena abajo de la región correspondiente en el genoma de una planta que no comprende la secuencia genética de interés, esta región puede reemplazarse por el molde que comprenda la secuencia génica de interés. De esta manera, la introducción de la secuencia génica de interés en una planta no necesita implicar múltiples retrocruzamientos, en particular en una planta de un acervo genético específico. De manera similar, una secuencia génica mutada de interés (por ejemplo, *matl* o *dmp*) puede proporcionarse como molde.

En algunas realizaciones, las mutaciones en los genes de interés descritos en el presente documento (por ejemplo, *matl* o *dmp*) pueden generarse sin el uso de un molde de recombinación a través de la introducción dirigida de roturas bicatenarias de ADN. Dichas roturas pueden repararse a través del proceso de unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés), que puede dar como resultado la generación de pequeñas inserciones o deleciones (indeles) en el sitio de reparación. Dichos indeles pueden conducir a mutaciones del marco de lectura que provocan codones finalizadores prematuros u otros tipos de mutaciones de pérdida de función

en los genes diana.

En algunas realizaciones, la edición génica puede implicar la expresión transitoria, inducible o constitutiva de los componentes o sistemas de edición génica en la planta
5 diana. La edición génica también puede implicar la integración genómica o la presencia episómica de los componentes o sistemas de edición génica en la planta diana.

En determinadas realizaciones, la modificación o mutación de ácido nucleico se efectúa mediante un sistema de
10 nucleasa con dedos de cinc (ZFN) (modificado). El sistema de ZFN utiliza enzimas de restricción artificiales generadas mediante la fusión de un dominio de unión al ADN con dedos de cinc con un dominio de escisión de ADN que puede genomanipularse para dirigirse a las secuencias de ADN
15 deseadas. Pueden encontrarse métodos de ejemplo de edición genómica usando ZFN, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N.º 6,534,261; 6,607,882; 6,746,838; 6,794,136; 6,824,978; 6,866,997; 6,933,113; y 6,979,539.

En determinadas realizaciones, la modificación de ácido
20 nucleico se efectúa mediante una meganucleasa (modificada), que son endodesoxirribonucleasas caracterizadas por un sitio de reconocimiento grande (secuencias de ADN bicatenario de 12 a 40 pares de bases). Puede encontrarse un método de ejemplo para usar meganucleasas en las Patentes de EE.UU. N.º:
25 8,163,514; 8,133,697; 8,021,867; 8,119,361; 8,119,381;

8,124,369; y 8,129,134, que se incorporan específicamente por referencia.

En determinadas realizaciones, la modificación de ácido nucleico se efectúa mediante un complejo o sistema CRISPR/Cas (modificado). En determinadas realizaciones, el sistema o complejo CRISPR/Cas es un sistema CRISPR/Cas de clase 2. En determinadas realizaciones, dicho sistema o complejo CRISPR/Cas es un sistema o complejo CRISPR/Cas de tipo II, de tipo V o de tipo VI. El sistema CRISPR/Cas no requiere la generación de proteínas personalizadas para dirigirse a secuencias específicas, sino que puede programarse una única proteína Cas mediante una guía de ARN (ARNg) para reconocer un diana de ácido nucleico específico, en otras palabras, la proteína enzimática Cas se puede reclutar a un locus diana de ácido nucleico específico (que puede comprender o consistir en ARN y/o ADN) de interés usando dicha guía de ARN corta.

En general, el sistema CRISPR/Cas o CRISPR como se usa en los documentos anteriores, se refiere colectivamente a transcritos y otros elementos implicados en la expresión o el direccionamiento de la actividad de genes asociados a CRISPR ("Cas"), incluyendo las secuencias que codifican un gen Cas y una o más de una secuencia tracr (transactivación de CRISPR) (por ejemplo, ARNtracr o un ARNtracr parcial activo), una secuencia tracr-mate (que abarca una "repetición directa" y una repetición directa parcial procesada por ARNtracr en el

contexto de sistema CRISPR endógeno), una secuencia guía (también denominada "espaciador" en el contexto de un sistema CRISPR endógeno) o "ARN(s)" como se usa este término en el presente documento (por ejemplo, ARN(s) para guiar Cas, tal como Cas9, por ejemplo, ARN de CRISPR y, en su caso, ARN transactivador (tracr) o un ARN guía simple (ARNgs) (ARN quimérico)) u otras secuencias y transcritos de un locus de CRISPR. En general, un sistema CRISPR se caracteriza por tener elementos que promueven la formación de un complejo CRISPR en el sitio de una secuencia diana (también denominado protoespaciador en el contexto de un sistema CRISPR endógeno). En el contexto de la formación de un complejo CRISPR, "secuencia diana" se refiere a una secuencia con la que una secuencia guía se diseña para que tenga complementariedad, en donde la hibridación entre una secuencia diana y una secuencia guía promueve la formación de un complejo CRISPR. Una secuencia diana puede comprender cualquier polinucleótido, tal como polinucleótidos de ADN o ARN.

En determinadas realizaciones, el ARNg es un ARN guía quimérico o un ARN guía simple (ARNgs). En determinadas realizaciones, el ARNg comprende una secuencia guía y una secuencia tracr mate (o repetición directa). En determinadas realizaciones, el ARNg comprende una secuencia guía, una secuencia tracr mate (o repetición directa) y una secuencia

tracr. En determinadas realizaciones, el sistema o complejo CRISPR/Cas como se describe en el presente documento no comprende y/o no depende de la presencia de una secuencia tracr (por ejemplo, si la proteína Cas es Cas12a).

5 La proteína Cas a la que se hace referencia en el presente documento, tal como, sin limitación, proteína Cas9, Cas12a (anteriormente denominada Cpf1), Cas12b (anteriormente denominada C2c1), Cas13a (anteriormente denominada C2c2), C2c3, Cas13b, puede proceder de cualquier fuente adecuada y,
10 por lo tanto, puede incluir diferentes ortólogos, procedentes de una diversidad de organismos (procariotas), tal como está bien documentado en la materia. En determinadas realizaciones, la proteína Cas es Cas9 (modificada), preferentemente Cas9 de *Staphylococcus aureus* (modificada)
15 (SaCas9) o Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (modificada) (SpCas9). En determinadas realizaciones, la proteína Cas es Cas12a, opcionalmente de *Acidaminococcus sp.*, tal como Cpf1 de *Acidaminococcus sp.* BV3L6 (AsCas12a) o Cas12a de bacterias *Lachnospiraceae*, tal como MA2020 de *Lachnospiraceae bacterium*
20 o MD2006 de *Lachnospiraceae bacterium* (LBCas12a). Véase la Pat. de EE.UU. N.º 10,669,540, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad. Como alternativa, la proteína Cas12a puede ser de *Moraxella bovoculi* AAX08_00205 [Mb2Cas12a] o *Moraxella bovoculi* AAX11_00205
25 [Mb3Cas12a]. Véase el documento WO 2017/189308, incorporado

en el presente documento por referencia en su totalidad. En determinadas realizaciones, la proteína Cas es C2c2 (modificada), preferentemente C2c2 de *Leptotrichia wadei* (LwC2c2) o C2c2 de *Listeria newyorkensis* FSL M6-0635 (LbFSLC2c2). En determinadas realizaciones, la proteína Cas (modificada) es C2c1. En determinadas realizaciones, la proteína Cas (modificada) es C2c3. En determinadas realizaciones, la proteína Cas (modificada) es Cas13b. Un experto en la materia puede disponer de otras enzimas Cas.

La maquinaria de edición génica (por ejemplo, la enzima modificadora de ADN) introducida en las plantas (por ejemplo, las plantas HI-NA) puede controlarse por cualquier promotor que pueda impulsar la expresión génica recombinante en el maíz. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor constitutivo. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor específico de tejido, por ejemplo, un promotor específico de polen o un promotor específico de espermatozoides, un promotor específico de cigotos o un promotor que se expresa a alto nivel en espermatozoides, óvulos y cigotos (por ejemplo, prOsActin1). Se desvelan promotores adecuados en la Pat. de EE.UU. N.º 10,519,456, cuyo contenido en su totalidad se incorpora en el presente documento por referencia. Se muestran promotores de ejemplo en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8. Lista de promotores adecuados para impulsar la

expresión de la maquinaria de edición en las plantas.

Lista de promotores: Promotores que pueden usarse en un transgén para conducir la alta expresión en espermatozoides de maquinaria de edición para reforzar la eficiencia de edición e inducción simultáneas de dobles haploides ("SEDHI, por sus siglas en inglés").			
Nombre del gen	ID del gen	Ortólogo del maíz	Ortólogo del arroz
DUO1	At3G60460	GRMZM2G105137, GRMZM2G046443	LOC_Os04g46384
MGH3	At1G19890	NA	NA
GEX1	At5G55490	GRMZM2G388045	LOC_Os09g27040, LOC_Os07g47194
GEX2	At5G49150	GRMZM2G036832	LOC_Os09g25650
GEX3	At5G16020	GRMZM2G458159	LOC_Os01g42060
HAP2/GSC1	At4G11720	GRMZM2G412911	LOC_Os05g18730
CycB1	At4G37490	NA	NA
DAZ1	At2G17180	GRMZM2G132057	NA
DAZ2	At4G35280	NA	LOC_Os02g19180
DAZ3	At4G35700	NA	NA
PCR11	At1G68610	NA	NA
DAN1	At3G04620	NA	NA
TIP1	AT3G47440	NA	LOC_Os04g46490
MKKK20	AT3G50310	NA	NA

DAF1	At3G62230	NA	NA
DAW1	At4G35560	GRMZM2G176647	NA
DAU2/DMP9	At5G39650	NA	NA
prOsActin1			Os03g0718150

5 En otro aspecto, el presente documento proporciona un método de edición de ADN genómico vegetal. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de una planta de maíz HI-NA que expresa una enzima de modificación de ADN y al menos un ácido nucleico guía opcional como se ha descrito

10 anteriormente para polinizar una planta diana que comprende el ADN genómico a editar. En algunas realizaciones, se selecciona al menos una progenie haploide del cruce. En algunas realizaciones, la progenie haploide comprende el genoma de la planta diana y no comprende el genoma de la

15 planta de maíz HI-NA. En algunas realizaciones, la progenie haploide no expresa la enzima de modificación de ADN. En algunas realizaciones, el genoma de la progenie haploide se ha modificado por la enzima de modificación de ADN y el ácido nucleico guía opcional suministrado por la planta de maíz HI-

20 NA. Este proceso, conocido como HI-Edit, se describe en las Patentes de EE.UU. N.º 10,519,456 10,285,348. Las plantas haploides editadas pueden entonces identificarse y tratarse con un agente duplicador, creando así una progenie de dobles haploides editada. Los ejemplos no limitantes de los agentes

25 duplicadores de cromosomas incluyen colchicina, pronamida,

dtipir, triflualina u otro agente antimicrotúbulo conocido. A continuación, las plantas diploides se cultivan hasta la madurez y se autopolinizan para generar semillas diploides editadas, que se usarán para procesos adicionales de
 5 mejoramiento y producción de semillas. Opcionalmente, todas las líneas de generación diploides pueden evaluarse para confirmar la existencia de ediciones homocigotas de sitio diana y la falta de maquinaria de edición génica.

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1. Mejoramiento de inductores de haploidía transformables

Líneas de maíz y marcadores de genotipado

Una línea inductora de haploidía transformable se puede reproducir cruzando una línea inductora de haploidía y una
 15 línea transformable. Es preferible usar una línea transformable que tenga un citotipo "A normal" (es decir, tenga un genotipo C/C para los marcadores SM2918 y/o SM4813 y SM2914, y/o un genotipo I/I para el marcador SM4812, como se ha descrito anteriormente) como el progenitor femenino y el
 20 donante de polen de la línea inductora de haploidía como el progenitor masculino, ya que esto asegura que el citotipo A normal se transmita a toda la progenie. Este citotipo conferirá una ventaja en la transformabilidad. También es preferible partir de un inductor de alto rendimiento (>15 %
 25 de tasa de inducción de haploidía) y de una variedad

sumamente transformable (frecuencia de transformación >15 %). También puede ser útil seleccionar una alta carga de polen o peso de la borla.

En este ejemplo, un material BC1 inductor de haploidía "RWKS/Z21S//RWKS" (BC1 significa generación de retrocruzamiento 1 = 75 % de RWKS y 25 % de Z21S) se cruzó con dos variedades transformables. El inductor de haploidía tiene una tasa de inducción de haploidía del 15-18 % (muy buena) y una tasa de transformación del 0 %. Este inductor se usó como donante de polen masculino y se cruzó en las espigas de dos líneas de maíz transformables comercialmente importantes: i) SYN-INBB23 (una línea *Non-Stiff Stalk*), que tiene una frecuencia de transformación del 5 %, una alta carga de polen y una tasa de inducción de haploidía del 0 %; y ii) SYN-INBC34 (una línea *Stiff Stalk*), que tiene una frecuencia de transformación del 50 %, una alta carga de polen y una tasa de inducción de haploidía del 0 %. Estos cruces se realizaron en RTP, estación de investigación de Carolina del Norte en la primavera de 2018. Ambas líneas SYN-INBB23 y SYN-INBC34 se identificaron como citotipo "A normal", mientras que la línea RWKS/Z21S//RWKS tiene un citotipo "B normal". En los ensayos que se muestran en la Tabla 9, SM2918 y SM4813 distinguen el citoplasma CMS (A/A) del citoplasma A o B normal (C/C); las tres líneas usadas para iniciar el proceso de mejoramiento tienen citoplasma

normal (C/C para los marcadores SM2918 y SM4813). SM2914 y SM4812 distinguen el citoplasma B normal (A/A y D/D, respectivamente) del citoplasma A normal (C/C e I/I, respectivamente). El citoplasma A normal está asociado en el maíz con la capacidad de transformarse y regenerar plantas transgénicas (véase, por ejemplo, el documento WO 2020/205334 de Skibbe et al.), mientras que el citoplasma B normal es más resistente a la transformación.

Tabla 9. Ensayos usados para detectar el tipo de citoplasma de las líneas de maíz

Marcador	SM29 18	SM4813	SM29 14	SM481 2	Determinación del citotipo
Cromosoma	Genoma mitocondrial				
UID del ensayo PanDa	4840 85	9999911 75	5075 73	11363 16	
RWKS/Z21/R WKS	C/C	C/C	A/A	D/D	B normal
SYN-INBB23	C/C	C/C	C/C	I/I	A normal
SYN-INBC34	C/C	C/C	C/C	I/I	A normal

"I" en el Ensayo SM4812: alelo de inserción; "D" en el Ensayo SM4812: alelo de delección.

RWKS/Z21S//RWKS se identifica como el material inductor de haploidía. Es importante destacar que este inductor de

haploidía tiene la mutación matrilineal nativa (*matl*; inserción de 4 pb). La mutación en MATRILINEAL (también conocida como NOT LIKE DAD y PLA1; ID del gen B73 del maíz GRMZM2G471240 en el Cromosoma 1) se ha descrito, por ejemplo, en la Pat. de EE.UU. N.º 10,448,588 de Kelliher et al. y Kelliher, et al., Nature, 2017. La mutación en MATRILINEAL confiere una tasa de inducción de haploidía (HIR) materna del 1 % al 7 % en solitario (es decir, sin el alelo *ghir8* HI, véase a continuación). HIR se refiere a la proporción de descendientes del cruce que son haploides; los demás, del 93 al 99 %, son diploides. Esta tasa puede verse afectada por las condiciones ambientales, así como por los acervos genéticos tanto de la línea inductora como de la línea femenina con la que se cruza. Los resultados de la tasa de inducción de haploidía que se muestran a continuación son típicos para las líneas inductoras de haploidía (por ejemplo, RWKS/Z21S//RWKS) y no inductoras (por ejemplo, SYN-INBB23 o SYN-INBC34). RWKS/Z21S//RWKS tiene una tasa de inducción más alta porque tiene alelos HI en otros QTL (por ejemplo, *ghir8*, véase más adelante) o genes que confieren una HIR más alta en combinación con *matl*. El alelo *matl* de inserción de 4 pb se puede detectar usando marcadores SNP específicos del sitio (SM7246 y SM7252) o marcadores TaqMan específicos de alelo (Ensayos 2826 y 2827), como se describe a continuación y en la Tabla 10. El ensayo 2826 detecta el alelo de tipo

silvestre; el ensayo 2827 detecta la inserción de 4 pb, un alelo mutante que desencadena la inducción de haploidía. Cabe apreciar que el genotipo "I" en el Ensayo SM7252 se refiere al alelo de inserción de cuatro pares de bases en el gen matrilíneal en la línea inductora de haploidía (que provoca una desactivación del gen) y el genotipo "D" se refiere al alelo en donde no hay inserción. El alelo "D" es la versión de tipo silvestre del gen en donde hay un producto proteico funcional.

Tabla 10. Ensayos y marcadores usados para detectar los alelos inductores y no inductores del gen MATRILINEAL.

Marcador	SM7246	SM7252	Ensayo 2826	Ensayo 2827	Prom. Tasa de inducción de haploidía (HIR)
ID del ensayo PanDa o TaqMan	4057030	4057033	TQ1838	TQ1839	
Ubicación (B73v5)	6943054 4	6943064 4	6943064 4	6943064 4	
RWKS/Z21S/RWKS	G/G	I/I	0 copia s	2 copia s	12 - 20%
SYN-INBB23	C/C	D/D	2 copia s	0 copia s	0.1 %
SYN-INBC34	C/C	D/D	2 copia s	0 copia s	0.1 %

Además, RWKS/Z21S//RWKS tiene un alelo potenciador de

inducción de haploidía (alelo HI) en un locus denominado en trabajos anteriores como *ghir8*, que se encuentra en el Cromosoma 9. Este alelo potencia la tasa de inducción de haploidía. En combinación con el alelo mutante *mat1*, este alelo QTL aumenta la tasa de inducción de haploidía de aproximadamente el 10 al 20 %, dependiendo de una serie de otros factores, tales como otros QTL/genes, las condiciones ambientales, el grupo genético del germoplasma femenino y, potencialmente, otros factores. Los marcadores de la Tabla 11 se pueden usar para distinguir las líneas que tienen el alelo *ghir8* HI de las que no lo tienen. La posición de *ghir8* se ha mapeado entre los marcadores SM4849 y SM0956BQ. El mapeo preciso y la edición del genoma han indicado que el gen responsable del alelo *ghir8* HI es GRMZM2G465053 (B73_v4) o Zm00001d044822 (B73v5), conocido como proteína de membrana 7 del dominio DUF679 (DMP para abreviar) y se encuentra en el genoma B73v5 entre las ubicaciones 3,919,235 y 3.919.852. El ensayo SM8133 se encuentra en el gen DMP.

Tabla 11. Ensayos usados para genotipificar la región *ghir8*.

Marcador	SM484	SM804	SM813	SM80	SM42	SM0956	Prom.
	9	7	3	29	57	BQ	Haplo
UID del ensayo PanDa	11363 95	45195 82	45197 23	4519 600	1004 889	482610	ide Tasa de

Ubicación (B73v5)	34444 22	38801 87	39200 09	4580 317	7248 352	113600 90	induc ción (HIR)
RWKS/Z21/RW KS	A/A	T/T	C/C	A/A	G/G	G/G	12 - 20%
SYN-INBB23	G/G				G/G	A/A	0.1%
SYN-INBC34	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	A/A	0.1%

Los espacios en blanco indican que el genotipo es desconocido o no puede determinarse usando estos ensayos.

Durante un cruce de inducción de haploidía basado en *mat1*, la gran mayoría de los embriones resultantes son diploides (normalmente entre el 65 y el 99 %) y de aproximadamente el 1 al 35 % son haploides (con un promedio quizás del 15-20 % para inductores de haploidía "buenos"). Es importante que las líneas de mejoramiento de dobles haploides tengan un rasgo visual controlado genéticamente para identificar aquellos embriones que carecen del conjunto de cromosomas inductores o ADN (haploides) y clasificarlos de aquellos que tienen el conjunto de cromosomas inductores o ADN (diploides). En el maíz, la mayoría de las líneas de mejoramiento de dobles haploides utilizan líneas inductoras que portan un alelo del gen R1 que confiere un rasgo de antocianina dominante que expresará un color púrpura o rojo tanto en el embrión como en el endospermo de la semilla. Hay al menos dos opciones: R-navajo (R-nj), un alelo asociado con

una expresión muy fuerte en la capa de aleurona (capa más externa del endospermo) y una expresión más débil en el embrión, y R1-scutellum (R1-SCM2), un alelo asociado con una fuerte expresión en el embrión inmaduro y una expresión más débil en el endospermo de aleurona. Ambos alelos están asociados con el locus R1, que está en el cromosoma 10, en torno a la posición ~139 Mb a ~140 Mb en la versión 5 del genoma endogámico del maíz B73 (B73v5). El inductor usado para el mejoramiento en este Ejemplo, RWKS/Z21S//RWKS, tiene R1-SCM2. Las líneas de plantas SYN-INBB23 y SYN-INBC34, como la mayoría del germoplasma élite de maíz, no tienen este alelo o el alelo R-nj en el locus R1 (estas líneas son de tipo silvestre para R1 y no tienen ninguna inducción de color en la semilla o el grano). De forma importante, los alelos de inducción de color R-nj y R1-SCM2 son dominantes sobre los de tipo silvestre. El germoplasma de maíz se puede ensayar usando los siguientes 3 marcadores vinculados (que se muestran en la Tabla 12) para distinguir el alelo R1-SCM2 (RWKS/Z21S//RWKS) de los alelos de tipo silvestre SYN-INBB23 y SYN-INBC34. Para SM0953BQ, SM6568 y SM0954BQ, los genotipos R1-SCM2 son A/A, T/T y C/C, mientras que los genotipos de tipo silvestre son G/G, A/A y A/A, respectivamente.

Además, hay un locus inhibidor de color en el germoplasma SYN-INBC34 en el Cromosoma 9, entre la posición 8 Mb y 10 Mb. Un alelo inhibidor de color en este locus evita

la acumulación de pigmento embrionario provocada por R1-SCM2. Si bien el mecanismo no está claro, si este alelo está presente en el contexto de R1-SCM2, es posible que el color del embrión no sea tan fuerte como normalmente. Durante el

5 mejoramiento de nuevos inductores con SYN-INBB23, se seleccionó el alelo R1-SCM2 de inducción de color del progenitor RWKS/Z21S//RWKS; durante el mejoramiento de nuevos inductores con SYN-INBC34, se seleccionó el mismo alelo además del alelo de tipo silvestre (es decir, no el alelo

10 inhibidor de color) para el inhibidor de color en el Cromosoma 9 (usando los ensayos que se muestran en la Tabla 12), por lo que los inductores resultantes tendrían un fuerte potencial de color.

15 **Tabla 12.** Ensayos usados para genotipificar los alelos marcadores de color y inhibidores de color.

Marca	SM095	SM095	SM656	SM095	SM660	SM80	SM809	Col
dor	4 BQ	4 HQ	8	3 BQ	4	40	1	or
Crom.	10					9		del
Rasgo / QTL/ Gen	Inductor de color dominante R1-SCM2					Inhibidor del color		emb rió n

	Ubicación (B73v5)	139300360	139300732	139789170	140146379	139789786	8120045	10040065	
5	UID del ensayo o PanDa	537327	545372	3775499	535601	3775416	4519585	4519705	
10	RWKS/ Z21// RWKS	C/C	G/G	T/T	A/A	G/G	G/G	C/C	Púrpura
15	SYN-INBB23	C/C	A/A	T/T	A/A	A/A			Crema
	SYN-INBC34	A/A		A/A	G/G		A/A	A/A	Crema

Los espacios en blanco indican que el genotipo es desconocido o no puede determinarse usando estos ensayos.

Mejoramiento de las líneas HI-NA

La primera etapa del mejoramiento de un nuevo inductor de haploidía transformable es fundamental: Se usa una línea transformable (por ejemplo, SYN-INBB23 o SYN-INBC34) como hembra en un cruce con una línea inductora de haploidía (por

ejemplo, RWKS/Z21S//RWKS). Tal cruce conferirá automáticamente citoplasma A normal a la descendencia F1 debido a la herencia citoplasmática materna, es decir, el óvulo femenino dona sus mitocondrias (y, por lo tanto, el
5 genoma mitocondrial) a su progenie, mientras que la célula germinal masculina (célula espermática, que se encuentra en los granos de polen) no transfiere las mitocondrias a la progenie. Aproximadamente 20 plantas F1 se cultivaron y se autopolinizaron, y algunas otras plantas F1 se retrocruzaron
10 con RWKS/Z21S/RWKS para generar aproximadamente 7000 F2 o progenie "BC1" (generación de retrocruzamiento 1) en total. Estas semillas de progenie también heredan automáticamente el citoplasma A normal. Las semillas SYN-INBB23 y SYN-INBC34 se clasificaron para el rasgo R1-SCM2 seleccionando semillas con
15 un color púrpura. Se descartaron las semillas de color amarillo. Las semillas de color amarillo constituían aproximadamente 1/4 de las semillas totales (3/4 eran de color púrpura), debido a la segregación mendeliana del alelo dominante R1-SCM2. Como se describe a continuación, se
20 germinaron plántulas y se tomaron perforaciones foliares de las ~5200 plantas BC1 o F2 con semillas de color púrpura y se genotipificaron para los marcadores inductores de haploidía descritos anteriormente.

La generación SYN-INBB23 x RWKS/Z21S/RWKS F2 y BC1 se
25 cultivó en el invernadero de RTP, Carolina del Norte en el

invierno de 2018/2019. Se tomaron muestras de todas las plantas germinadas (5219 en total): se obtuvieron cuatro perforaciones foliares de hojas de plántulas. Se extrajo el ADN y se ejecutó un análisis TaqMan en los ensayos como se ha descrito anteriormente. Específicamente, la PCR en tiempo real se configuró en reacciones TaqMan multiplexadas para amplificar simultáneamente el gen diana y un gen de control endógeno. Para cada muestra, el ensayo se configuró combinando la muestra de ADN genómico extraído con la mezcla maestra de PCR TaqMan (que contenía Jumpstart Taq ReadyMix (Sigma) complementada con cebadores y sondas). La PCR en tiempo real se realizó en máquinas de PCR en tiempo real, usando los siguientes parámetros: 95 °C durante 5 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 30 segundos. Se realizó el análisis de datos posterior a la ejecución de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para obtener más detalles sobre el procedimiento TaqMan, véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2011/0300544 (presentada el 7 de diciembre de 2009), incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad.

Después de puntuar las determinaciones de genotipado, de más de 5000 plantas, se seleccionaron 117 que se genotipificaron con combinaciones genotípicas favorables inductoras de haploidía (véase la Tabla 13 para ver un

resumen de las plantas que se seleccionaron y no se seleccionaron, junto con sus genotipos), se trasplantaron a macetas grandes y se autopolinizaron para producir semillas para la siguiente generación, aunque algunas eran haploides y no podían autopolinizarse debido a la esterilidad. Se encontró que muchos individuos eran homocigotos fijos para todos los locus inductores de haploidía, aunque debido a la distorsión de la segregación frente a *mat1* y el alelo *ghir8* HI, se conservaron plantas adicionales que eran heterocigotas para R1-SCM2 o el alelo *ghir8* HI para mantener una mayor diversidad genética entre las familias F3/BC1F2. La progenie procedente de estas plantas se está segregando, por lo que han de genotipificarse como generación F3/BC1F2 antes del fenotipado HIR (cruzamiento de prueba), como se describe a continuación. El inhibidor del color, del que no se sabía que afectara a la inducción del color en el acervo SYN-INBB23, se fijó de manera consistente para el alelo inductor de haploidía (es decir, el alelo de tipo silvestre) en este conjunto de 117 plantas para garantizar la inducción del color. Las espigas F3 o BC1F2 seleccionadas se enviaron a Janesville, Wisconsin, durante el verano de 2019 (descrito a continuación).

Tabla 13. Selección de plantas SYN-INBB23 F2 y BC1 para la siguiente generación.

Crom.	1	1	9	9	10	10	Núm
--------------	---	---	---	---	----	----	------------

5	Ensayo	SM72 52	SM72 46	SM48 49	SM09 56BQ	SM09 54HQ	SM66 04	ero de Pla nta s
	Ensayo PanDa	4057 030	4057 030	1136 395	4826 10	5453 72	3775 416	
	Gen/QTL	<i>matl</i>	<i>matl</i>	<i>qhir</i> 8	<i>qhir</i> 8	R1- SCM2	R1- SCM2	
	Fijo para todos	II	GG	AA	GG	GG	GG	30
	Fijo para todos los retrocruzados	II	GG	AA	GG	GG	GG	22
10	R1-SCM2 het	II	GG	AA	GG	AG	AG	38
	R1-SCM2 retrocruzado	II	GG	AA	GG	AG	AG	12
	<i>qhir8</i> het	II	GG	AG	GG	GG	GG	15
15	otro	Genotipos mixtos (descartados)						500 2

"II" en el ensayo SM7252 se refiere a la homocigosidad para el alelo *matrilineal* mutante de inserción de cuatro pares de bases mutante que es responsable de la inducción de haploidía.

20 En la población SYN-INBC34 F2, se identificaron 194 individuos que tenían combinaciones genotípicas inductoras de haploidía favorables (véase la Tabla 14 para un resumen de las plantas que se seleccionaron y no se seleccionaron, junto con sus genotipos). Estos se seleccionaron y se
25 autopolinizaron para producir semillas para la siguiente

generación, aunque algunos eran haploides y no podían autopolinizarse debido a la esterilidad. Varios se fijaron (homocigotos) para todos los locus inductores de haploidía. Debido a la distorsión de la segregación frente a *mat1* y el alelo *qhir8* HI, se conservaron otras plantas que se encontró que heterocigotas para R1-SCM2, *mat1* o el alelo *qhir8* HI más el alelo inhibidor de color cerca de *qhir8* en el Cromosoma 9 para mantener una mayor diversidad genética entre las familias F3. La progenie procedente de estas plantas se estaba segregando, por lo que era necesario genotipificarlas en la generación F3 antes de cualquier fenotipado HIR (cruzamiento de prueba), como se muestra a continuación. En la SYN-INBC34 x RWKS/Z21S//RWKS F2, las plantas también se seleccionaron por heterocigosidad u homocigosidad del alelo RWKS/Z21S/RWKS para el gen inhibidor de color en el Cromosoma 9, para evitar incorporar el alelo SYN-INBC34, que actúa como un inhibidor de la acumulación de color. Esta población SYN-INBC34 x RWKS/Z21S//RWKS F2 se cultivó en Janesville, Wisconsin, durante el verano de 2019. A continuación, se enviaron espigas F3 seleccionadas (de F2 autopolinizadas) a Graneros, Chile para la fenotipificación como se describe a continuación.

Tabla 14. Selección de plantas SYN-INBC34 F2 para la siguiente generación.

Crom.	9	9	9	10	10	1	1	Número de
--------------	---	---	---	----	----	---	---	------------------

5

10

15

ID del ensayo	1136 395	1004 889	4826 10	5373 27	5356 01	4057 033	4057 030	plantas
Estado	SM48 49	SM42 57	SM09 56BQ	SM09 54BQ	SM09 53BQ	SM72 46	SM72 52	
fijado	AA	GG	GG	CC	AA	GG	II	30
matl het	AA	GG	GG	CC	AA	CG	DI	74
Inhibid or heteroc igoto de qhir8/R 1	AG	CG	AG	CC	AA	GG	II	54
R1-SCM2 het	AA	GG	GG	AC	AG	GG	II	36
otro	Genotipos mixtos (sin cruzar)							3057

20

25

Para la siguiente generación SYN-INBB23 x RWKS/Z21S//RWKS, se plantaron 520 hileras en la estación de mejoramiento de Janesville, Wisconsin en el verano de 2019, que comprendían 95 subfamilias F3 y 35 subfamilias BC1F2, plantadas por cuadruplicado, más controles. Para cada hilera, se plantaron una o más filas de hembras de prueba al lado. Para SYN-INBC34 x RWKS/Z21S//RWKS, se sembraron 699 hileras que representan aproximadamente 187 subfamilias F3 (plantadas

por duplicado o cuadruplicado) en la estación de mejoramiento de Graneros, Chile, junto con hileras de hembras de prueba. Para la mayoría de las subfamilias, se obtuvieron muestras de hojas para el genotipado de los locus inductores de haploidía *ghir8* y/o R1-SCM2 (y, para SYN-INBC34, para el locus inhibidor de color). Los individuos seleccionados que eran homocigotos para los alelos RWKS/Z21S//RWKS fueron nominados para cruzarse como machos en varias espigas de las hembras de prueba. En total, se hicieron cruces de prueba de 777 individuos más varios controles de la generación SYN-INBB23 F3. De manera similar, se hicieron cruces de prueba de 813 individuos, incluidos los controles, a partir de la generación SYN-INBC34 F3. El equipo de campo seleccionó los fenotipos negativos, tal como baja producción de polen o largo intervalo antesis-floración femenina. La tasa de inducción de haploidía se determinó cosechando espigas de cruce de prueba de aproximadamente 15 a 20 días después de la polinización y, a continuación, aislando los embriones de los granos en una placa de Petri que contenía medios de rescate de embriones (4.43 gramos de medios de referencia de Murashige y Skoog con vitaminas, 30 gramos de sacarosa y 70 miligramos de ácido salicílico). Las placas de Petri se expusieron a la luz (véase, por ejemplo, como se describe en el documento WO2015/104358). Se contó el número de embriones de color púrpura (diploides) y color crema (haploides) de

cada espiga, para encontrar la frecuencia de haploides, conocida como tasa de inducción de haploidía (HIR), y el total de embriones por espiga. Las plantas que se usaron para los cruces de prueba también se autopolinizaron; la semilla se recolectó de espigas autopolinizadas de este conjunto selecto de plantas F3 o BC1F2 para generar semillas F4 o BC1F3. En la Tabla 15 (SYN-INBC34) y la Tabla 16 (SYN-INBB23), se muestran la tasa de inducción de haploidía, los genotipos marcadores y el total de embriones (divididos en embriones haploides y diploides) de parcelas representativas, así como algunas líneas de medio y bajo rendimiento sin *matl* y el alelo *ghir8* HI fijo. La Tabla 15 muestra líneas F3 SYN-INBC34 x RWKS/Z21S//RWKS fijadas para todos los alelos HI, así como líneas que eran homocigotas de tipo silvestre o heterocigotas para el alelo *ghir8* HI y/o *matl*. Todas las líneas se fijaron para el alelo inhibidor de color y el gen R1-SCM2 que da el embrión de color púrpura en diploides. Las líneas fijadas para todos los alelos inductores variaron entre el 10-19 % de HIR, similar al control (RWKS/Z21S//RWKS), mientras que otras líneas tenían tasas de inducción de haploidía inferiores. La Tabla 16 muestra las líneas F3 SYN-INBB23 x RWKS/Z21S//RWKS fijadas para todos los alelos HI. Todas las líneas se fijaron para el gen R1-SCM2 que da el embrión de color púrpura en diploides.

A partir de la generación F3 en SYN-INBB23 x

RWKS/Z21S//RWKS, se identificaron 63 plantas individuales obtenidas de 47 familias obtenidas de F2 diferentes que se fijaron para los alelos inductores de haploidía para *mat1*, *ghir8* y R1-SCM2 y tenían al menos una tasa de inducción de haploidía del 10 % y al menos 70 granos por conjunto de semillas de espiga. Aquellas espigas autopolinizadas de estos individuos que tenían al menos 20 granos se cosecharon y se enviaron a la siguiente generación y se usaron para plantar una o más hileras macho para cruces de prueba adicionales (cruzamiento de prueba de generación F4 para determinar la tasa de inducción de haploidía) y, adicionalmente, en la mayoría de los casos, se enviaron algunas semillas para realizar pruebas de la tasa de transformación de la generación F4. Asimismo, los datos de la generación F3 en la población SYN-INBC34 x RWKS/Z21S//RWKS se usaron para identificar 71 individuos obtenidos de 41 familias F3 que se fijaron para los genes inductores y tenían una tasa de inducción de haploidía >10 % y un alto conjunto de semillas, y en donde había al menos 20 granos por espiga autopolinizada. Estos se enviaron a la generación F4.

Tabla 15. Tasa de inducción de haploidía (HIR) y marcadores para las líneas F3 SYN-INBC34 x RWKS/Z21S//RWKS representativas.

Línea	Gen/Tipo	<i>mat1</i>		<i>qhir8</i>		Inhibido r del color		R1-SCM2		Rep.	Embriones totales		HIR	Embrión Color
		SM7246	SM7252	SM4849	SM4257	SM4263	SM0956BQ	SM0954BQ	SM0953BQ		Haploides	Diploides		
RWKS/Z 21S//R WKS	Control/ todas fijadas	GG	II	AA	GG	AA	GG	CC	AA	22	1067	6488	16.4%	púrpura
19BD91 5888	F3/todas fijadas	GG	II	AA	GG	AA	GG	CC	AA	4	191	999	19.1%	púrpura
19BD91 5935	F3/todas fijadas	GG	II	AA	GG	AA	GG	CC	AA	4	409	2956	12.2%	púrpura

25	20	15	10	5										
19BD91 5954	F3/todas fijadas	GG	II	AA	GG	AA	GG	CC	AA	4	483	2176	18.2%	púrpura
19BD91 5988	F3/todas fijadas	GG	II	AA	GG	AA	GG	CC	AA	4	292	1642	15.1%	púrpura
19BD91 5994	F3/todas fijadas	GG	II	AA	GG	AA	GG	CC	AA	4	288	2393	10.7%	púrpura
19BD91 5893	F3/ - <i>qhir8</i>	GG	II	GG	CC	AA	GG	CC	AA	3	146	2276	6.0%	púrpura
19BD91 5901	F3/ - <i>qhir8</i>	GG	II	GG	CC	AA	GG	CC	AA	4	130	1756	6.9%	púrpura
19BD91 5913	F3/ - <i>qhir8</i>	GG	II	GG	CC	AA	GG	CC	AA	2	15	535	2.7%	púrpura
19BD91 5981	F3/ <i>qhir8</i> het	GG	II	AG	GC	AA	GG	CC	AA	2	21	296	6.6%	púrpura
19BD91 5962	F3/ <i>qhir8</i> het	GG	II	AG	GC	AA	GG	CC	AA	1	23	216	9.6%	púrpura
19BD91 6054	F3/ - <i>mat1</i>	CC	DD	AA	GG	AA	GG	CC	AA	1	6	1159	0.5%	púrpura

25	20	15	10	5										
19BD91 5914	F3/ - matl	CC	DD	AA	GG	AA	GG	CC	AA	1	20	1709	2.9%	púrpura
19BD91 5920	F3/matl het	GC	DI	AA	GG	AA	GG	CC	AA	1	12	465	2.5%	púrpura
19BD91 5906	F3/matl het	GC	DI	AA	GG	AA	GG	CC	AA	1	37	1048	3.4%	púrpura
Promedio de todos (-valores atípicos)	F3/todas fijadas	GG	II	AA	GG	AA	GG	CC	AA	38 5	24,2 41	185, 456	11.6%	púrpura

"Rep." se refiere al número de réplicas; cada réplica consistió en el polen de una planta macho cruzada de prueba con al menos cuatro espigas de prueba híbridas de élite cada vez. La fila final tiene los totales para todas las líneas de plantas fijadas para el alelo QTL inductor en esta generación.

Tabla 16. Tasa de inducción de haploidía (HIR) y marcadores para las líneas F3 SYN-INBB23 x RWKS/Z21S//RWKS representativas.

Línea	Tipo	Mat1		qhir8		R1-SCM2		Rep.	Embriones totales		HIR	Embrión Color
		SM7246	SM7252	SM4849	SM4257	SM0954BQ	SM0953BQ		Haploide s	Diploide s		
RWKS/Z21S//RWKS	Control	GG	II	AA	GG	CC	AA	10	1365	7514	15.4%	púrpura
19SBI110630	F3	GG	II	AA	GG	CC	AA	2	141	888	13.7%	púrpura
19SBI110664	F3	GG	II	AA	GG	CC	AA	3	327	1372	19.2%	púrpura
19SBI110704	F3	GG	II	AA	GG	CC	AA	2	138	584	19.1%	púrpura
19SBI110705	F3	GG	II	AA	GG	CC	AA	2	110	849	11.5%	púrpura
19SBI110757	F3	GG	II	AA	GG	CC	AA	3	218	968	18.4%	púrpura
19SBI110711	BC1F2	GG	II	AA	GG	CC	AA	2	227	1453	13.5%	púrpura
19SBI110715	BC1F2	GG	II	AA	GG	CC	AA	2	194	999	16.3%	púrpura
19SBI110722	BC1F2	GG	II	AA	GG	CC	AA	2	138	601	18.7%	púrpura

25	20	15	10	5									
Promedio de todas las F3 fijadas	F3 fijada	GG	II	AA	GG	CC	AA	87	4902	30,37 3	13.9%	púrpura	

"Rep." se refiere al número de réplicas; cada réplica consistió en el polen de una planta macho cruzada de prueba con al menos cuatro espigas de prueba híbridas de élite cada vez. La fila final tiene los totales de todas las líneas de plantas F3 fijadas para el QTL inductor en esta generación (menos los valores atípicos y las líneas con bajo conjunto de semillas debido a una mala mella o floración asincrónica de los estigmas de la línea de prueba y el polen inductor).

Para la generación SYN-INBB23 x RWKS/Z21S//RWKS F4 (140 hileras macho de 81 líneas de plantas diferentes según los datos del fenotipado F4 HIR usando una o, normalmente, dos hileras x 2 machos de prueba, cada uno en Graneros, Chile, 5 temporada 2019/2020), no se realizó el genotipado ya que todas las líneas ahora estaban completamente fijadas para los genes/locus de la tasa de inducción de haploidía. El fenotipado de la tasa de inducción de haploidía se realizó en las instalaciones de mejoramiento y dobles haploides de 10 Arica, Chile, y se realizaron pruebas de transformación en un subconjunto de ~60 de los mismos materiales vegetales F4 en el centro de investigación de RTP, Carolina del Norte. Para las pruebas de la tasa de transformación, el vector binario n.º 12672 se suministró a embriones combinados de entre 3 y 15 10 espigas F4 autopolinizadas mediante transformación mediada por *Agrobacterium* usando la cepa LBA4404 (pAL4404, pVGW7). Se describe información detallada sobre el plásmido auxiliar pAL4404 y pVGW7 y la región de virulencia en las siguientes referencias: Teruyuki Imayama, T. et al., Sol. de Patente Japonesa N.º 20160083737, JAPAN TOBACCO INC., JAPÓN, 2016; 20 Ishida, Y., High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nat. Biotechnol. 14, 745-750 (1996); y Negrotto, D., et al., The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover 25 transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium*

transformation. Plant Cell Rep. 19, 798-803 (2000). La cepa de *Agrobacterium* que contenía los vectores binarios y las construcciones de prueba se preparó como se describe por Negrotto et al. (2000), mencionado anteriormente. Para la transformación del maíz, se usaron embriones inmaduros de la línea endogámica de maíz cultivada en invernadero NP2222 como explantes según Heng Zhong, et al., Advances in *Agrobacterium*-mediated Maize Transformation. Methods Mol Biol 1676, 41-59 (2018). El aislamiento de embriones inmaduros, la inoculación de *Agrobacterium* y el cocultivo de *Agrobacterium* con los embriones inmaduros se realizaron según lo descrito por Zhong et al., como se ha mencionado anteriormente. Los tejidos transformados y los supuestos eventos transgénicos se generaron en medios usando selección con manosa como se ha descrito anteriormente (Negrotto et al. (2000)). Los resultados de fenotipado para las líneas de plantas F4 (materiales vegetales) se resumen en la Tabla 17.

Tabla 17. Tasa de inducción de haploidía (HIR) y frecuencia de transformación (TF) de materiales vegetales F4 de las poblaciones SYN-INBB23 x RWKS/Z21S//RWKS.

Id del material vegetal	N.º de explantes	Eventos	TF	HIR	Embriones totales
19BD915005	184	0		15.8%	599
19BD915016	353	0		11.0%	615

5	19BD915019	199	5	2.5%	7.9%	783
	19BD915044	119	0		14.1%	628
	19BD915057	308	0		9.9%	835
	19BD915066	146	0		18.2%	504
	19BD915072	216	0		11.9%	573
10	19BD915086	140	0		26.6%	356
	19BD915121	77	0		16%	761
	19BD915147	184	19	10.3%	15.2%	552
	19BD915158	80	9	11.3%	12.2%	156
	19BD915186	109	0		14.8%	637
15	19BD915207	95	0		20.8%	859
	19BD915229	186	1	0.5%	13.0%	604
	19BD915245	296	7	2.4%	14.6%	840
	19BD915243	40	0		20.0%	656
	19BD915248	300	0		11.9%	489
20	19BD915263	120	0		23.0%	336
	19BD915300	99	0		15.1%	329
	19BD915311	96	0		10.1%	603
	19BD915360	134	4	3.0%	10.1%	485
	19BD915363	152	0		10.1%	773
25	19BD915409	328	0		27.8%	295
	19BD915411	393	0		12.3%	607
	19BD915416	82	0		9.7%	647
	19BD915418	143	1	0.7%	16.8%	540

	19BD915436	183	6	3.3%	9.3%	335
	19BD915452	194	0		8.7%	883
	19BD915465	270	0		12.2%	181
	19BD915489	150	0		13.3%	358
5	19BD915561	237	0		7.5%	604
	19BD915614	329	0		21.5%	771
	19BD915690	150	0		17.2%	313
	19BD915840	89	0		15.4%	622
	19BD915847	245	0		20.8%	800
10	19BD915875	309	31	10.0%	15.0%	498
	19BD915880	82	0		9.3%	215

La mayoría de los eventos no fueron transformables con la construcción y el protocolo ensayados, pero muchos eventos tuvieron fuertes tasas de inducción de haploidía. Esto tiene sentido porque los genes de la tasa de inducción de haploidía se seleccionaron en las generaciones F2 y F3, y el fenotipo se seleccionó en la F3, mientras que no hubo selección en la transformabilidad (y solo hubo una frecuencia de transformación de ~5 % para empezar en SYN-INBB23 y del 0 % en RWKS/Z21S//RWKS). Cabe apreciar que la tasa de inducción de haploidía se basa en varias espigas de cruce de prueba en dos líneas de prueba. El total de embriones (es decir, el conjunto de semillas) se vio fuertemente afectado por el mellado y la cantidad de espigas que se polinizaron. El total de embriones no se usó como métrica de selección; simplemente

pretende mostrar el número de embriones en los que se basa la tasa de inducción de haploidía. Se identificaron tres materiales vegetales con una tasa de transformación superior al 10 %: 19BD915147, 19BD915875 y 19BD915158. Los dos
5 primeros también tenían una HIR prometedora >15 %.

Se usaron pruebas adicionales de HIR para limitarse a los mejores inductores que también eran transformables. En el verano de 2020, en la estación de mejoramiento de Janesville, Wisconsin, se plantaron 41 hileras macho de la generación
10 SYN-INBB23 x RWKS/Z21S//RWKS F5, obtenidas de 10 familias de la generación F3 y varias subfamilias F4, junto con tres filas hembra de prueba para cruces de prueba para evaluar la tasa de inducción de haploidía. Las semillas de algunas de estas líneas también se enviaron a las instalaciones de
15 Carolina del Norte para volver a analizar la frecuencia de transformación. Los resultados de un conjunto selecto de ensayos de generación F4 y F5 se muestran en la Tabla 18. Estas cinco líneas son líneas inductoras de haploidía de alto rendimiento en la generación F5; hay alguna evidencia de transformabilidad en las primeras tres líneas (ya sea de las
20 pruebas de tasa de transformación de F4 o F5). Las líneas que se muestran son las elegidas para reenviar a los experimentos HI-Edit en la generación F6, como se describe a continuación.

Tabla 18. Pruebas de tasa de inducción de haploidía
25 (HIR) y frecuencia de transformación (TF) en la generación

SYN-INBB23 x RWKS/Z21S//RWKS F4 y F5.

5

10

15

ID del material vegetal F4	Tasa TF de F4	HIR de F4	ID del material vegetal F5	Tasa TF de F5	HIR de F5	Conjunto de semillas F5	Haplotidos/espigas (F5)
19BD9	10.3%	15.2%	19SN9	n/d	12.7%	146	19
15147			52821				
19BD9	0%	26.6%	19SN9	n/d	13.7%	194	26
15086			52822				
19BD9	0%	16%	19SN9	1.3%	17.0%	173	31
15086			52871				
19BD9	0%	20.0%	19SN9	n/d	10.3%	284	29
15121			52763				
19BD9	0%	20.0%	19SN9	n/d	18.0%	172	31
15243			53098				

20

La semilla de la generación F6 se recolectó de las espigas autopolinizadas de estas plantas y se envió a la siguiente generación para la prueba HI-Edit. Véase el Ejemplo 2 para la transformación CRISPR-Cas y la prueba HI-Edit. En pruebas anteriores, el uso de BBM aumentó la frecuencia de transformación del material vegetal precursor (véase la Tabla 19).

25

Tabla 19. La transformación mediada por BBM aumenta la

eficiencia de transformación en el material vegetal precursor.

	12672 (Control)	23967 (BBM)
Material vegetal: SYN-INBB23	45 eventos/400 emb riones	99 eventos/400 emb riones

5

10

15

20

Para la generación SYN-INBC34 x RWKS/Z21S//RWKS F4, se realizó un ensayo de inducción de haploidía en la estación de mejoramiento de Janesville, Wisconsin, en el verano de 2020. Los 71 materiales vegetales seleccionados mencionados anteriormente se plantaron y se cruzaron de prueba con tres conjuntos de espigas de prueba femeninas; a los 15 a 20 días después de la polinización, las espigas se enviaron de nuevo al sitio de RTP, NC para la evaluación de la HIR. Al mismo tiempo, se determinó la tasa de transformación de un subconjunto de líneas en el sitio de RTP usando el mismo proceso de transformación que se ha descrito anteriormente, y se obtuvo una semilla de la generación F5 de un subconjunto seleccionado de plantas autopolinizadas y se envió a la siguiente generación. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Tasa de inducción de haploidía (HIR) y frecuencia de transformación (TF) de materiales vegetales F4 de las poblaciones SYN-INBC34 x RWKS/Z21S//RWKS.

ID del	ID del	Embri ones	Eve nto	% de	N.º tota	Tasa de	Haploid es/	Conjun to de
--------	--------	------------	---------	------	----------	---------	-------------	--------------

25

5

10

15

20

25

mate rial vege tal	mater ial veget al F3 (fami lia)		s	TF	l de espi gas de prue ba	induc ción	espiga	semill as promed io
19SN 9518 94	19BD9 15935	206	0	0. 0%	12	15.7%	35	221
19SN 9519 05	19BD9 15954	no ensayado			11	15.3%	21	135
19SN 9519 15	19BD9 16026	no ensayado			11	14.5%	18	129
19SN 9519 24	19BD9 15945	228	0	0. 0%	12	21.7%	40.6	188
19SN 9519 26	19BD9 15950	no ensayado			11	13.3%	31	232
19SN 9519 29	19BD9 15954	173	0	0. 0%	12	17.7%	28.7	162
19SN	19BD9	56	0	0.	8	10.2%	21.1	207

5	9519 33	15973			0%				
	19SN 9519 50	19BD9 15935	187	0	0. 0%	12	13.8%	24	173
	19SN 9519 58	19BD9 15950	no ensayado			12	13.2	38.5	293
	19SN 9519 81	19BD9 15945	332	2	0. 6%	12	15.9%	26.5	167
10	19SN 9519 86	19BD9 15954	125	0	0. 0%	10	15.9%	28	177
	19SN 9520 15	19BD9 15942	13	0	0. 0%	9	17.4%	20	114
	19SN 9520 19	19BD9 15955	no ensayado			11	17.5%	37	194
	19SN 9520 30	19BD9 15988	345	2	0. 6%	12	9.0%	18	194
15	19SN 9520 15	19BD9 15942	13	0	0. 0%	9	17.4%	20	114
	19SN 9520 19	19BD9 15955	no ensayado			11	17.5%	37	194
20	19SN 9520 30	19BD9 15988	345	2	0. 6%	12	9.0%	18	194
	19SN 9520 15	19BD9 15942	13	0	0. 0%	9	17.4%	20	114
25	19SN 9520 15	19BD9 15942	13	0	0. 0%	9	17.4%	20	114
	19SN 9520 15	19BD9 15942	13	0	0. 0%	9	17.4%	20	114

	34								
	19SN 9520 43	19BD9 16033	361	5	1. 4%	12	no ensayado		
	19SN 9520 47	19BD9 16050	210	1	0. 5%	12	12.3%	25.4	207
5									
	19SN 9520 59	19BD9 15953	80	0	0. 0%	11	14.5%	30	205
	19SN 9520 60	19BD9 15957	87	0	0. 0%	11	6.4%	18	281
	19SN 9520 67	19BD9 15987	215	0	0. 0%	9	18.2%	25	141
10									
	19SN 9520 72	19BD9 16020	no ensayado			11	18.0%	36	200
	19SN 9520 80	19BD9 16043	no ensayado			6	6.0%	14	234
	19SN 9520 91	19BD9 15891	174	0	0. 0%	9	13.5%	27	200
15									
20									
25									

5	19SN 9521 23	19BD9 15978	166	0	0. 0%	11	16.2%	28.5	179
	19SN 9521 39	19BD9 16024	259	0	0. 0%	7	15.5%	27.7	176
	19SN 9521 53	19BD9 16055	320	0	0. 0%	11	13.7%	23.4	171
10	19SN 9521 61	19BD9 15967	316	24	8. 1%	9	11.4%	15.3	134
15	19SN 9521 83	19BD9 16075	273	24	9. 0%	9	11.9%	26.8	225
	19SN 9521 88	19BD9 16051	no ensayado			11	19.0%	30.3	156
	19SN 9521 89	19BD9 16051	no ensayado			11	11.4%	13.6	119
20	19SN 9521 95	19BD9 16017	no ensayado			9	15.2%	20	134
25	19SN	19BD9	265	148	58	10	13.3%	27.2	204

	47							
	19SN 9523 48	19BD9 16055	231	1	0. 4%	10	10.0%	17 177
5	19SN 9523 58	19BD9 15967	159	2	1. 3%	12	9.9%	16.2 165
10	19SN 9523 61	19BD9 15907	166	2	1. 2%	4	5.0%	12.5 250
	19SN 9524 02	19BD9 15942	68	0	0. 0%	11	15.1%	25 170
15	19SN 9524 06	19BD9 15952	40	0	0. 0%	12	12.9%	22 181
	19SN 9524 08	19BD9 15956	259	0	0. 0%	12	6.5%	15 226
20	19SN 9524 24	19BD9 15995	178	0	0. 0%	12	12.6%	28.6 246
25	19SN 9524 26	19BD9 15995	no ensayado			11	14.0%	24 174

5	19SN 9524 29	19BD9 16009	23	5	21 .7 %	12	13.0%	20	149
	19SN 9524 41	19BD9 16050	no ensayado			12	10.4%	26	254
10	19SN 9524 54	19BD9 15949	293	40	13 .7 %	12	15.2%	33.1	217
	19SN 9524 56	19BD9 15953	no ensayado			8	16.1%	30	195
15	19SN 9525 51	19BD9 15967	76	0	0. 0%	12	10.5%	24	221
	19SN 9525 82	19BD9 15888	no ensayado			12	9.5%	19.7	207
20	19SN 9526 10	19BD9 16050	300	0	0. 0%	12	11.8%	32	278
	19SN 9526 27	19BD9 15984	13	0	0. 0%	12	15.4%	34	223
25	19SN	19BD9	111	3	2.	12	11.1%	27	248

9526 46	15966			7%				
19SN 9526 70	19BD9 16024	159	3	0. 0%	11	10.2%	23	216
19SN 9526 88	19BD9 15967	64	0	0. 0%	12	7.0%	10.4	149

Algunas líneas presentaron una alta frecuencia de transformación en este experimento, pero la mayoría de las líneas tenían tasas de inducción de haploidía muy altas (la mayoría por encima del 10 % y algunas por encima del 15 %). Este resultado es consistente con la selección de genes de inducción de haploidía (marcadores) en las generaciones F2 y F3 y la selección de fenotipo HIR alto en la generación F3. Por lo tanto, esta población se enriqueció para la genética de la tasa de inducción de haploidía. Por el contrario, no había habido selección de fenotipos o genes (marcadores) de transformabilidad hasta este punto, más allá del uso de un progenitor materno de citotipo A normal (SYN-INBC34) en el cruce híbrido fundador. La HIR se basa en varias espigas cruzadas de prueba en dos líneas de prueba y se proporciona el número total de espigas. El conjunto de semillas podría verse afectado por el intervalo antesis-floración femenina (la sincronización de la ventana de liberación del polen del

macho inductor y la fecha de floración femenina de la espiga de prueba femenina). En este experimento, el intervalo de antesis-floración femenina fue inferior que en la generación F3 (es decir, hubo una reducción en el tiempo entre la liberación del polen y la floración femenina de la espiga de prueba). Por lo tanto, además de la tasa de inducción de haploidía y la tasa de transformación, el conjunto de semillas se usa como una métrica de selección para identificar las mejores líneas para enviar a la siguiente ronda de evaluación (la generación F5). El promedio de conjunto de semillas se encontró dividiendo el número total de granos normales (no abortados, con endospermo viable) por el número de espigas, combinando ambos probadores.

Dos líneas F4 mostraron un rendimiento prometedor. Primero está la línea 19SN952196, que tuvo una frecuencia de transformación (TF) del 58 % (más alta que cualquier otra tasa de transformación de línea de maíz conocida), una HIR prometedora superior al 13 % y un buen conjunto de semillas. En segundo lugar, está la línea 19SN952454, que tuvo un 13.7 % de TF, una HIR superior al 15 % y un buen conjunto de semillas. Estas dos líneas promediaron 27 y 33 haploides por espiga, respectivamente. Las fotografías de las espigas de prueba revelaron que no había una sincronización perfecta entre el macho y la hembra: es posible que las espigas se polinizaran un poco antes, porque el 1/3 superior de la

espiga no se polinizó. Por lo tanto, es probable que el conjunto de semillas y las métricas de haploides por espiga sean aún mayores. Varias plantas individuales de estos dos materiales vegetales se autopolinizaron para generar lotes de
5 semillas F5 para una evaluación adicional, incluida la prueba de rendimiento de la tasa de inducción de haploidía, así como la transformación usando una construcción CRISPR-Cas para evaluar la tasa de HI-Editing en diferentes variedades de maíz (pruebas de espectro HI-Edit). Las líneas F5 obtenidas
10 de 19SN952196 se transformaron usando un proceso sencillo basado en *Agrobacterium*, como se ha descrito anteriormente para la generación F4, pero esta vez usando una construcción CRISPR-Cas. Las líneas F5 de 19SN952454 se transformaron también usando un proceso sencillo basado en *Agrobacterium*,
15 como se ha descrito anteriormente para la generación F4, pero esta vez usando una construcción CRISPR-Cas. Además, las líneas F5 de 19SN952454 se transformaron usando un proceso de transformación asistida por BBM, en donde una construcción BBM y la construcción CRISPR-Cas se cotransformaron juntas
20 para mejorar la frecuencia de transformación de la construcción CRISPR-Cas. Véase el Ejemplo 2 para las transformaciones.

Además, había algunas líneas con un fuerte rendimiento de la tasa de inducción de haploidía pero sin una buena
25 frecuencia de transformación (por ejemplo, 19SN951924) o sin

datos de tasa de transformación (debido a la falta de semillas disponibles para la prueba, por ejemplo, 19SN951958, 19SN952019 y 19SN952072). Estas líneas promediaron entre 35 y 40 haploides por espiga. Varios individuos de estos cuatro materiales vegetales F4 se autopolinizaron para generar lotes de semillas F5 para una evaluación adicional, incluida la prueba de rendimiento de la tasa de inducción de haploidía adicional, así como la transformación usando una construcción CRISPR-Cas para evaluar la tasa de HI-Editing en diferentes variedades de maíz (pruebas de espectro HI-Edit). Las líneas F5 obtenidas de 19SN951924, 19SN951958, 19SN952019 y 19SN952072 se transformaron mediante una transformación asistida por BBM, en donde una construcción BBM y la construcción CRISPR-Cas se cotransformaron juntas para mejorar la frecuencia de transformación (véase el Ejemplo 2).

Para identificar los factores genéticos responsables de la transformabilidad en el acervo SYN-INBC34, las plantas precursoras usadas para generar las líneas F4 estudiadas anteriormente (en la Tabla 20) se genotipificaron usando 480 marcadores SNP polimórficos repartidos uniformemente por el genoma del maíz. El análisis GWAS de las líneas en la Tabla 20 que fueron probadas por transformación condujo a la identificación de un QTL en el cromosoma 3, entre los marcadores SM3158 (el genotipo de SYN-INBC34 es GG, el marcador está en la posición 14,742,407 de B73v5) y SM4586

(el genotipo de SYN-INBC34 es GG, el marcador está en la posición 70,562,070 de B73v5). Los marcadores SM4787 (genotipo SYN-INBC34 de GG), SM3814 (genotipo SYN-INBC34 de CC), SM3362 (genotipo SYN-INBC34 de GG) y SM0634AQ (genotipo SYN-INBC34 de GG) se posicionan entre SM3158 y SM4586 y también pueden funcionar para identificar el QTL. Comparando el conjunto de líneas con una frecuencia de transformación >5 % con aquellas con un 0 %, SM4787 tiene un valor GWAS log10 de 1.7 y un valor de $p < 0.02$, y SM4586 tiene un valor log10 de 0.57, y SM3362 tiene un valor log10 de 0.90. Comparando el conjunto de líneas con una TF >5 % con aquellas con una TF <5 %, SM3814 tiene un valor GWAS log10 de 1.6, y SM4787 y SM3158 son 1.3. En la Tabla 21 a continuación, se muestran los genotipos de todas las líneas de plantas ensayadas por TF. Siete de las diez principales líneas transformables con la tasa de transformación más alta tienen el genotipo SYN-INBC34 favorable (subrayado). Una gran pluralidad de la TF <1 % o líneas no transformables tienen los alelos desfavorables (RWKS).

Basándose en esta información, la selección de plantas que tienen el alelo SYN-INBC34 en este QTL (denominado en el presente documento qCYTO-A_TF3.1) en la F2, F3 o cualquier otra generación puede enriquecer las líneas resultantes para la transformabilidad (es decir, puede conducir a frecuencias de transformación más altas), en combinación con el citotipo

A normal o solo. Este alelo QTL de alta tasa de transformación no se ha identificado en trabajos anteriores en la transformación del maíz. Sin quedar ligado a ninguna teoría en particular, puede ser que la interacción o
5 comunicación nuclear-citoplasmática fomentada por uno o más locus en el citotipo A normal (ya sea en mitocondrias o en los cloroplastos), en combinación con uno o más locus en este QTL, se combinen para producir altas tasas de transformación.

10

15

20

25

Tabla 21. Tasas de transformación de diversas líneas ("materiales vegetales").

ID del material vegetal 1 F4	Ca ll os	Even tos	TF	SM3158	SM4787	SM3814	SM3362	SM0634A Q	SM4586	Genotipo
			Cromosoma	3	3	3	3	3	3	
			Posición en el mapa	40.8	42.4	47.4	51.5	58.5	63.2	
			Posición física	14,742,407	19,210,942	28,710,708	32,750,671	58,719,312	70,562,070	
SYN-INBC34	1340	619	49.1%	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	<u>G/G</u>	<u>Favorable</u>
19SN952196	265	148	58.5%	A/G	A/G	A/C	A/G	GG	G/G	Heterocigoto

25			20			15			10			5	
19SN95 2429	23	5	21.7%	G/G	G/G	C/C	G/G	C/G	A/G	Favorable			
19SN95 2199	18 8	31	16.5%	A/G	A/G	A/C	A/G	C/G	A/G	Heterocigoto			
19SN95 2454	29 3	40	13.7%	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G	Favorable			
19SN95 2183	27 3	24	9.0%	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G	Favorable			
19SN95 2161	31 6	24	8.1%	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G	Favorable			
19SN95 2646	11 1	3	2.7%	A/G	A/G	A/C	A/G	C/G	A/G	Heterocigoto			
19SN95 2200	14 6	3	2.1%	G/G	G/G	A/C	A/G	C/G	A/G	Favorable			
19SN95 2253	51	1	2%	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G	Favorable			
19SN95 2043	36 1	5	1.4%	Z/Z	Z/Z	Z/Z	Z/Z	Z/Z	A/G	N/D			

25			20			15			10			5	
19SN95 2358	15 9	2	1.3%	A/G	A/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G			Recombi nante
19SN95 2346	32 0	4	1.3%	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A				Desfavo rable
19SN95 2361	16 6	2	1.2%	A/A	A/A	A/A	A/A	C/G	A/G				Desfavo rable
19SN95 2030	34 5	2	0.6%	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G			Favorab le
19SN95 2347	32 0	2	0.6%	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G			Desfavo rable
19SN95 1981	33 2	2	0.6%	G/G	G/G	C/C	A/A	C/C	A/A				Favorab le
19SN95 2047	21 0	1	0.5%	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A				Desfavo rable
19SN95 2348	23 1	1	0.4%	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A				Desfavo rable
19SN95 2091	17 4	0	0.0%	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A				Desfavo rable

25			20			15			10			5	
19SN95 2015	13	0	0.0%	G/G	G/G	Z/Z	G/G	G/G	G/G	G/G	Recombi nante		
19SN95 2402	68	0	0.0%	A/G	A/G	A/C	G/G	G/G	G/G	G/G	Heteroc igoto		
19SN95 2406	40	0	0.0%	A/G	A/G	A/C	A/G	C/G	A/G	A/G	Recombi nante		
19SN95 2059	80	0	0.0%	A/G	A/G	A/C	A/G	C/G	A/G	A/G	Heteroc igoto		
19SN95 2408	25 9	0	0.0%	G/G	G/G	C/C	A/A	C/C	A/A	A/A	Favorab le		
19SN95 2060	87	0	0.0%	A/A	A/A	A/A	A/G	C/G	A/G	A/G	Desfavo rable		
19SN95 2025	28 5	0	0.0%	A/A	A/A	A/A	A/G	C/G	A/G	A/G	Desfavo rable		
19SN95 2551	76	0	0.0%	A/A	A/A	C/C	A/G	C/G	G/G	G/G	Recombi nante		
19SN95 2688	64	0	0.0%	A/A	A/A	C/C	A/G	C/G	A/G	A/G	Recombi nante		

25			20			15			10			5	
19SN95 2123	16 6	0	0.0%	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	Favorab le		
19SN95 2311	94	0	0.0%	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A	Desfavo rable			
19SN95 2627	13	0	0.0%	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A	Desfavo rable			
19SN95 2067	21 5	0	0.0%	A/G	A/G	A/C	G/G	G/G	G/G	Heteroc igoto			
19SN95 2262	22 8	0	0.0%	A/A	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	Desfavo rable			
19SN95 2424	17 8	0	0.0%	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A	Desfavo rable			
19SN95 2034	13 3	0	0.0%	A/G	A/G	Z/Z	G/G	G/G	G/G	Heteroc igoto			
19SN95 2139	25 9	0	0.0%	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A	Desfavo rable			
19SN95 2670	15 9	3	0.0%	A/G	Z/Z	A/C	A/A	C/C	A/A	Recombi nante			

25			20			15			10			5	
19SN95 2610	30 0	0	0.0%	A/G	A/G	A/C	A/G	C/G	A/G	Heteroc igoto			
19SN95 2153	32 0	0	0.0%	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A	Desfavo rable			
19SN95 1933	56	0	0.0%	G/G	G/G	A/A	A/A	C/C	A/A	Recombi nante			
19SN95 1929	17 3	0	0.0%	A/G	A/G	A/C	A/G	C/G	A/G	Heteroc igoto			
19SN95 1986	12 5	0	0.0%	A/G	A/A	A/C	A/A	C/C	A/A	Heteroc igoto			
19SN95 1924	22 8	0	0.0%	A/A	Z/Z	A/A	A/G	C/G	A/G	Desfavo rable			
19SN95 1894	20 6	0	0.0%	A/G	A/A	A/C	A/G	C/G	A/G	Desfavo rable			
19SN95 1950	18 7	0	0.0%	A/G	A/G	A/C	A/A	C/C	A/A	Heteroc igoto			
RWKS	28 0	0	0.0%	A/A	A/A	A/A	A/A	C/C	A/A	Desfavo rable			

25	20	15	10	5					
z21s	no ensayado	supuest o 0	G/G	A/A	C/C	G/G	C/C	A/A	

Para verificar la importancia de este QTL en la transformabilidad del maíz, se evaluó el rendimiento de transformación de un conjunto diverso de materiales vegetales con un citotipo A normal y se genotipificaron para este QTL. Las cinco líneas menos transformables (TF <0.5 %) no tenían los genotipos favorables para todos estos marcadores. Por el contrario, todas las líneas que tenían TF superiores al 13 % tenían genotipos favorables para todos los marcadores o no tenían suficientes datos (véase la Tabla 22). Todas las líneas que se muestran eran homocigotas para los marcadores, lo que no sorprende ya que son líneas vegetales endogámicas.

Se evaluaron ciento setenta y dos marcadores en el intervalo QTL del cromosoma 3, y se realizó una determinación de genotipado basada en si el SNP presente coincidía con el SNP de SYN-INBC34. La Tabla 23 enumera los marcadores adicionales evaluados en el intervalo QTL del cromosoma 3, junto con las coordenadas genómicas en el genoma de referencia B73v5 y el genotipo de cada marcador en SYN-INBC34 (es decir, en el alelo TF en el qCYTO-A_TF3.1 TF-QTL). Se contó cualquier desajuste entre una variedad determinada y SYN-INBC34, y el número total de desajustes en la región QTL se presenta en la Tabla 22. A partir de estos datos, se hizo una nota de interpretación ("Favorable" se refiere a al menos el 85 % o al menos el 95 % de concordancia con SYN-INBC34).

Cabe apreciar que todas las variedades sumamente transformables tenían el alelo favorable, mientras que las variedades no transformables tendían a no tener el alelo favorable.

Tabla 22. Pruebas de tasa de transformación y datos de genotipado para el QTL del cromosoma 3 para una diversidad de líneas de maíz de variedad A normal de germoplasma tanto non-stiff stalk como stiff stalk.

Variedad	Explantes	Eventos	TF	N.º de desajustes con respecto a SYN-INBC34	Interpretación/notas
SYN-INBM16	400	0	0	113/172	Desfavorable
SYN-INBN17	298	0	0	0/41 para los primeros 41 hasta AXM9959 (a ~25 Mb), a continuación 72/131	Desfavorable

SYN- INBO1 8	300	0	0	80/172	Desfavorable
SYN- INBP1 9	634	2	0.3	83/172	Desfavorable
SYN- INBQ2 0	576	4	0.7	0/58 para los primeros 58 hasta AXM458 (a ~29 Mb), a continuación 66/114	Recombinante en el extremo 3'
SYN- INBS2 1	250	2	0.8	86/172	Desfavorable
SYN- INBA1 2	2379	34	1.4	95/172	Desfavorable
SYN- INBT2 2	6570	156	2.4	55/172	Desfavorable

SYN- INBU2 4	2838	99	3.5	0/172	Favorable
SYN- INBV2 5	1490	68	4.6	0/67 para los primeros 67 hasta AXM6245 (a ~31 Mb), a continuaci ón 62/105	Favorable
SYN- INBB2 3	535	25	4.7	66/172	Desfavorable
SYN- INBW2 6	2690	167	6.2	1/172	Favorable
SYN- INBX2 7	4803	370	7.7	105/172	Desfavorable

SYN- INBY2 8	1320	119	9	0/88 para los primeros 88 marcadores hasta AXM4798 (a ~37 Mb), a continuaci3n 45/84	Favorable
SYN- INBZ2 9	2131	262	12. 3	0/172	Favorable
SYN- INBAA 30	1084	137	12. 6	0/52 para los primeros 52 marcadores hasta AXM6243 (a ~28 Mb), a continuaci3n 32/120	Favorable, recombinante en 3'

SYN- INBAB 31	3779	477	12. 6	0/172	Favorable
SYN- INBAC 32	3000	383	12. 8	0/172	Favorable
SYN- INBAD 33	2806842	426643	15. 2	0/172	Favorable
SYN- INBAE 35	720	144	20	0/172	Favorable
SYN- INBAF 36	2561	675	26. 4	0/172	Favorable
SYN- INBAG 37	729	281	38. 5	0/172	Favorable
SYN- INBC3 4	1340	619	46. 2	0/172	Favorable

Tabla 23. Marcadores adicionales evaluados en el intervalo TF-QTL del cromosoma 3.

Marcador	Cromosoma	Ubicación	Genotipo de
----------	-----------	-----------	-------------

		(B73v5)	SYN-INBC34
AXM9160314338013G/GAXM13055	3	14338719	C/C
AXM5023	3	14739707	G/G
AXM14922	3	15640904	G/G
AXM8839	3	15913372	G/G
AXM370	3	16413750	A/A
AXM8867	3	16413900	A/A
AXM1625	3	16413990	G/G
AXM13506	3	16414044	A/A
AXM4412	3	16414254	A/A
AXM3449	3	16957568	C/C
AXM7950	3	16957664	G/G
AXM7949	3	16958032	A/A
AXM9161	3	17365780	A/A
AXM10413	3	17549738	A/A
AXM12909	3	17997280	A/A
AXM9162	3	18166040	G/G
AXM9163	3	18187484	A/A
AXM6232	3	18647436	G/G
AXM6233	3	18649732	A/A
AXM934	3	18871362	A/A
AXM5348	3	19707290	G/G
AXM1323	3	19810620	A/A

AXM3844	3	19820740	C/C
AXM6235	3	20813686	A/A
AXM11235	3	20999452	G/G
AXM869	3	21004152	G/G
AXM132	3	21008904	G/G
AXM6236	3	21198226	A/A
AXM8682	3	21323478	A/A
AXM3022	3	21879448	A/A
AXM2496	3	22051712	C/C
AXM7951	3	22052548	A/A
AXM10414	3	22277748	G/G
AXM3023	3	22640936	A/A
AXM6239	3	22673002	A/A
AXM9164	3	22674272	A/A
AXM9165	3	24395398	A/A
AXM3450324407084A/AAXM883 8	3	24859396	G/G
AXM9959	3	25354518	G/G
AXM3024	3	25690814	C/C
AXM3025	3	25808968	A/A
AXM7952	3	25812382	G/G
AXM5828	3	27138684	A/A
AXM10417	3	27140574	G/G
AXM10418	3	27343412	G/G

AXM6241	3	27356728	A/A
AXM6242	3	27426036	A/A
AXM10419	3	27834516	A/A
AXM14975	3	28238924	G/G
AXM6243	3	28455532	G/G
AXM10420	3	28467692	A/A
AXM8854	3	28626512	G/G
AXM7953	3	28628344	A/A
AXM9167	3	28669234	G/G
AXM3026	3	28710708	C/C
AXM870329092988A/AAXM498	3	29675612	G/G
AXM6244	3	30519364	G/G
AXM1324	3	30691728	A/A
AXM8625	3	30978854	A/A
AXM8626	3	30980042	A/A
AXM10421	3	31046284	G/G
AXM10422	3	31082950	G/G
AXM11461	3	31149944	A/A
AXM6245	3	31291772	A/A
AXM6246	3	31623896	G/G
AXM409	3	31637688	A/A
AXM10423	3	31702984	G/G
AXM1986	3	31838034	A/A

AXM3291	3	32005100	C/C
AXM6247	3	32097760	A/A
AXM8865	3	32671358	G/G
AXM871	3	32750672	G/G
AXM7954	3	35057272	G/G
AXM285	3	35200456	A/A
AXM13047	3	35352788	A/A
AXM1809	3	35356328	C/C
AXM1808	3	35356344	C/C
AXM1737	3	35357320	G/G
AXM3845	3	35448892	C/C
AXM12060	3	35461896	T/T
AXM5305	3	35462028	A/A
AXM7955	3	36558100	A/A
AXM7956	3	36558692	A/A
AXM9784	3	36672744	G/G
AXM11671	3	37806864	G/G
AXM4798	3	37807620	A/A
AXM10048	3	37807984	A/A
AXM4575	3	37808092	G/G
AXM3452	3	38519576	C/C
AXM10426	3	38779764	A/A
AXM676	3	38785376	A/A

AXM144	3	38862600	A/A
AXM7958	3	38953312	A/A
AXM7957	3	38960964	G/G
AXM3027	3	38961232	A/A
AXM3028	3	39045360	C/C
AXM9822	3	39049120	G/G
AXM3722	3	39320176	C/C
AXM9169	3	39322240	G/G
AXM12965	3	39396080	A/A
AXM11	3	39648640	C/C
AXM13414	3	39912984	C/C
AXM5267	3	39913008	G/G
AXM6248	3	40862720	A/A
AXM6249	3	40876556	A/A
AXM6250	3	42357728	G/G
AXM3029	3	42553584	A/A
AXM13302	3	42679580	G/G
AXM7959	3	42826796	G/G
AXM6251	3	42826820	A/A
AXM3030	3	42936224	C/C
AXM2823	3	43323964	A/A
AXM8681	3	43326200	A/A
AXM593	3	43702296	G/G

AXM3031	3	44580704	C/C
AXM1327	3	44760860	A/A
AXM7962	3	44763836	G/G
AXM6252	3	44773872	A/A
AXM14378	3	44812172	C/C
AXM10427	3	45429580	A/A
AXM6253	3	45760672	A/A
AXM280	3	45761036	A/A
AXM6254	3	47325636	A/A
AXM9172	3	47386428	G/G
AXM9173	3	48600904	A/A
AXM2501	3	48716792	C/C
AXM872	3	50321164	A/A
AXM3846	3	51064844	A/A
AXM757	3	51120380	A/A
AXM9174	3	52093972	A/A
AXM10428	3	52510540	A/A
AXM13114	3	53036960	A/A
AXM10429	3	53438152	G/G
AXM6255	3	53554544	A/A
AXM12985	3	53777484	G/G
AXM3848	3	53863872	A/A
AXM7965	3	53864056	A/A

AXM1328	3	53869128	A/A
AXM6256	3	54002792	A/A
AXM2502	3	54023072	C/C
AXM10430	3	54060920	G/G
AXM3736	3	54061120	C/C
AXM6257	3	55352672	G/G
AXM2504	3	56948728	A/A
AXM628	3	57051432	C/C
AXM9175	3	57538200	A/A
AXM9176	3	58039744	A/A
AXM7456	3	58288984	A/A
AXM2505	3	58292876	A/A
AXM2362	3	58484552	C/C
AXM14092	3	58484620	C/C
AXM564	3	58484764	C/C
AXM9177	3	58540328	A/A
AXM7631	3	58718560	A/A
AXM2177	3	58719312	A/A
AXM13524	3	58719384	G/G
AXM13134	3	58920420	G/G
AXM14444	3	59698344	A/A
AXM2506	3	59857832	A/A
AXM6259	3	60050424	A/A

AXM2819	3	60061320	C/C
AXM6260	3	60271872	A/A
AXM9178	3	60746916	A/A
AXM14448	3	60953728	A/A
AXM10431	3	60956976	A/A
AXM1330	3	64699880	G/G
AXM873	3	66279428	G/G
AXM9922	3	66376932	A/A
AXM3032	3	67404376	A/A

Ejemplo 2. Tasa de transformación y prueba HI-Edit

Al menos cuarenta semillas de lotes de semillas de espiga de la generación F6 individuales de los materiales vegetales obtenidos de SYN-INBB23 x RWKS que se muestran en la Tabla 24 se plantaron para su transformación en el invernadero en el Syngenta Biotechnology Innovation Center ubicado en Research Triangle Park, Carolina del Norte en diciembre de 2020.

Tabla 24. Materiales vegetales obtenidos de SYN-INBB23 x RWKS/Z21S//RWKS plantados para pruebas de tasa de transformación.

Material	ID del material vegetal F5	Vectores	Cas12+ Eventos embriones iniciados	Tasa de /TF
-----------------	-----------------------------------	-----------------	---	--------------------

RWKS/Z21/RWKS	control	26258 + 24288	0 / 800	0.00%
20BD917228	19SN952821	26258	7 / 800	0.90%
		26258 + 24288	29 / 450	6.40%
20BD917233	19SN952822	26258	17 / 1100	1.50%
		26258 + 24288	36 / 450	8.00%
20BD917237	19SN952871	26258	0 / 750	0.00%
		26258 + 24288	4 / 1200	0.30%
20BD917621	19SN952763	26258 + 24288	0 / 938	0.00%
20BD917284	19SN953098	26258 + 24288	8 / 1872	0.40%

Por separado, se plantaron aproximadamente 40 semillas combinadas de cuatro espigas de generación F5 de los materiales vegetales SYN-INBC34 x RWKS que se muestran en la Tabla 25 para su transformación en el invernadero en la misma instalación, en enero de 2021.

Tabla 25. Materiales vegetales obtenidos de SYN-INBC34 x RWKS/Z21S//RWKS plantados para pruebas de tasa de transformación.

Código	ID del material vegetal F4	Vectors	Cas12+ Eventos embriones iniciados	Tasa de TF
20ALL1134VG MM	19SN952454	26258 + 24288	22 / 300	7.3 %
20ALL1134VH MM	19SN952019		4 / 325	1.2 %
20ALL1134VI MM	19SN951958		9 / 436	2.1 %

20ALL1134VJ MM	19SN951924		15 / 750	2.0 %
20ALL1134VL MM	19SN952072		32 / 470	6.8 %
20ALL1134VK MM	19SN952196	26258	62 / 300	20.7 %

Se construyó una construcción binaria, vector ID n.º 26258 (Fig. 2; SEQ ID NO: 171), para la transformación de embriones inmaduros de generación F7 a partir de estos materiales vegetales. El vector comprende un casete de marcador seleccionable de fosfomanosa isomerasa (PMI), así como un casete Cas12a de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR), y dos casetes que contienen los ARN guía de Cas12a diseñados para dirigirse a los siguientes genes y secuencias: *Opaque2* en el cromosoma 7 (Zm00001d018971, CTGTATCTCGAGCGTCTGCTGA; SEQ ID NO: 172), *Waxy1* en el crom. 9 (Zm00001d045462, GGGAAAGACCGAGGAGAAGATCT; SEQ ID NO: 173), *Endosperm1* Amarillo en el crom. 6 (Zm00001d036345, CTATCTTATCCTAAAGATGGTGG; SEQ ID NO: 174), *E3 ubiquitina ligasa2* en el crom. 2 (Zm00001d004139, GGAGGGAAAAGGTGTCTGAGGC; SEQ ID NO: 175), y una supuesta proteína ubiquitina ligasa en el crom. 5 (Zm00001d014920, GGAAGGAAAAGGTATCTGAAGG; SEQ ID NO: 176). Los ARN guía de CRISPR/LbCas12a incluían una repetición directa de la *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 LbCrRNA. Cabe apreciar que también podría usarse un casete Cas9 (que requeriría el uso de diferentes métodos de multiplexación y ARN guía) en

lugar de Cas12a (de hecho, en la Patente de EE.UU. N.º 10519456 de Q. Que y T. Kelliher, la Patente de EE.UU. N.º 10285348 Q. Que y T. Kelliher, así como Kelliher, T. et al., One step genome editing of elite crop germplasm (2019) Nature Biotechnology Volumen 37, páginas 287-292, se usó un vector Cas9 para la edición del genoma basada en HI-Edit). Además de transformar 4 materiales vegetales transformables (19SN952821, 19SN952822, 19SN952871 y 19SN952196) con este vector usando un protocolo de transformación estándar (descrito anteriormente en el Ejemplo 1), los embriones de las tres primeras de estas líneas más otras siete líneas con HIR alta y el conjunto de semillas (19SN952763, 19SN953098, 19SN952454, 19SN952019, 19SN951958, 19SN951924, 19SN952072) se co-transformaron con el vector 24288 (Fig. 3; SEQ ID NO: 177), que llevaba un casete *WUSCHEL* de *Sorghum bicolor* (cSbWUS-01; SEQ ID NO: 178) y un casete *BABYBOOM1* de *Brassica napus* (cBnBBM1-02; SEQ ID NO: 179) para aumentar el número de transformantes en ciertas variedades, un sistema de escisión CRE-LOX inducible por sequía para permitir la eliminación de los casetes *WUS*, *CRE* y *BBM1* después del enraizamiento. Las frecuencias de transformación de todos estos experimentos se indican en las tablas 24 y 25.

También se pueden utilizar los siguientes genes de desarrollo para aumentar la frecuencia de transformación:

BBM, BBM-WOX5, WOX5 (véase, por ejemplo, el documento PCT/US2020/045573, incorporado en el presente documento por referencia). Como referencia, se ha validado la transformación asistida por BBM, WUS2 o BBM-WUS2 en maíz (Lowe et al. (2016) Morphogenic Regulators Baby boom and Wuschel Improve Monocot Transformation, *Plant Cell* 28, 1998-2015; Hoerster, et al. (2020) Use of non-integrating ZmWus2 vectors to enhance maize transformation, *In Vitro Cellular & Developmental Biology*; Mookkan et al., (2017) Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators BABY BOOM and WUSCHEL2, *Plant Cell Reports* 36:1477-1491). Como alternativa, se puede impulsar la transformación usando el sistema GRF5 (Kong et al. (2020) Overexpression of Transcription Factor Growth Regulating Factor5 Improves Transformation of Monocot and Dicot Species, *Front. in Plant Sci*, Vol. 11, Art. 572319) o utilizando GRF4-GIF1 (J.M. Debernardi, et al. (2020), A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nature Biotechnology* 38: 1274-1279).

Al mismo tiempo que los experimentos de transformación de las tablas 24 y 25, las líneas parentales que entraron en la transformación también se reexaminaron en cuanto a las características de rendimiento de la inducción haploide en el

verano de 2021 (basándose en el promedio de HIR y el conjunto de semillas de 3 espigas de dos líneas de prueba cada una, y la alta tasa de inducción y el conjunto de semillas se confirmaron en general para todas las líneas que se sometieron a la transformación Cas12a 26258. La línea superior de SYN-INBC23 x RWKS (acervo Iodent) después del trabajo de 2021 fue 20BD917233 (procedente de 19SN952822), que mantuvo una tasa de inducción haploide y unas características de conjunto de semillas muy fuertes (en 2021, la tasa de inducción fue del 15.8 %, con 207 semillas por espiga (total 32.3 haploides por espiga), y que tuvo un rendimiento y rasgos agronómicos superiores en las pruebas de campo, y tuvo una tasa de transformación baja pero estable (1.5 %) que fue mejorada por la co-administración mediante *agrobacterium* con el vector 24288 (cSbWUS-01 y cBnBBM1-02 de refuerzo) hasta un 8.0 % (Tabla 24). En un experimento distinto, la tasa de transformación de 20BD917233 a través de la transformación mediada por *agrobacterium* de un vector de edición del genoma Cas12a fue del 1.0 % (dos eventos Cas12a-positivos de 196 embriones), y esto se mejoró con la co-administración mediante *agrobacterium* con el vector 25072 (SEQ ID NO: 180), que contenía el gen homeobox WUSCHEL BdWOX5/7 (SEQ ID NO: 181) de *Brachypodium distachyon* (Bradi2g55270), impulsado por el promotor Ubi1 del maíz (SEQ

ID NO: 182), al 7.0 % (diecisiete eventos Cas12a-positivos de 242 embriones).

Para las familias SYN-INBC34 x RWKS, la línea superior no estaba clara. 20ALL1134VG_MM era un fuerte inductor y tuvo una tasa de transformación del 7 % en presencia de BBM / WUS, pero las notas de campo indicaron amarillamiento y otros problemas agronómicos. El germoplasma más transformable fue 20ALL1134VK_MM (TF al 20.7 %), pero tuvo una tasa de inducción haploide de media a baja (de aproximadamente un 6 %) en 2021 (Tabla 26). Para identificar una línea superior de las familias SYN-INBC34 x RWKS (es decir, una nueva línea HI-Edit *stiff stalk* (tallo rígido) con una alta tasa de TF y una fuerte HIR), se utilizaron los datos de HIR de 2021 para seleccionar un nuevo panel de inductores de élite que estuvieran estrechamente relacionados con los inductores transformables probados y que procedían originalmente de 19SN952454 y 19SN952196 (son primos / líneas parientes de la generación F5 a F7, procedentes de la misma familia F4). Los que están en negrita en la Tabla 26 estaban en transformación y regenerando callo en el momento de la presentación final de este documento.

Tabla 26. Resultados del rendimiento de la tasa de inducción haploide de 2021 de F5 a F7 procedentes de los dos mejores *inductores transformables procedentes de F4*,

19SN952454 y 19SN952196, de *SYN-INBC34* x *RWKS/Z21S//RWKS*. Los que están en negrita están en pruebas de transformación para evaluar la tasa de TF.

Línea masculina	Comprobado	Semillas	Haploides	Diploides	HIR %	haploides / espiga
Inductor haploide de élite control	1	481	83	398	17.3	27.7
	2	619	147	426	25.7	52.9
20ALL1134VG_MM (TF comprobada en 2021)	1	826	74	526	12.3	34.0
	2	508	99	409	19.5	33.0
Pariente n.º1 procedente de 19SN952454	1	872	71	529	11.8	34.4
	2	945	97	503	16.2	50.9
Pariente n.º2 procedente de 19SN952454	1	710	39	561	6.5	15.4
	2	775	85	491	14.8	38.1
Pariente n.º3 procedente de 19SN952454	1	823	67	533	11.2	30.6
	2	813	82	518	13.	37.0

					7	
Pariente n.º41 procedente de 19SN952454	1	864	91	509	15. 2	43.7
	2	583	91	452	16. 8	32.6
Pariente n.º51 procedente de 19SN952454	1	891	65	535	10. 8	32.2
	2	875	92	508	15. 3	44.7
20ALL1134VK_M M (TF comprobada en 2021)	1	424	23	401	5.4	7.7
	2	219	17	202	7.8	5.7
Pariente n.º.11 procedente de 19SN952196	1	521	56	437	11. 4	19.7
	2	609	76	494	13. 3	27.1
Pariente n.º21 procedente de 19SN952196	1	726	65	535	10. 8	26.2
	2	371	62	309	16. 7	20.7
Pariente n.º.3 procedente de 19SN952196	1	556	56	489	10. 3	19.0
	2	684	93	496	15.	36.0

					8	
Pariente n.º4 procedente de 19SN952196	1	777	44	548	7.4	19.2
	2	763	50	550	8.3	21.2
Pariente n.º5 procedente de 19SN952196	1	619	47	538	8.0	16.6
	2	501	51	450	10. 2	17.0
Pariente n.º6 procedente de 19SN952196	1	828	40	560	6.7	18.4
	2	644	68	504	11. 9	25.5

Los eventos se generaron y se ensayaron para las inserciones de ADN-T usando el ensayo 2723 de TaqMan (que amplifica el gen PMI-14) y 3633 (que amplifica el transgén LbCas12a). Los eventos T0 se enviaron al invernadero, se cultivaron hasta la floración y se autopolinizaron para generar semillas T1. Las plantas de generación T0 se sometieron a pruebas de edición para identificar qué eventos T1 tienen una alta actividad CRISPR para su uso en ensayos HI-Edit. Para evaluar la edición del sitio diana, se utilizarán ensayos TaqMan de alelos nativos que dan un alto número de copias de PCR para alelos de "tipo silvestre" no editados, pero que no amplifican o exploran tan fuertemente con alelos editados. Dado que se está utilizando Cas12a, se espera que las ediciones habituales sean pequeñas deleciones

(normalmente, la edición de Cas12a conduce a deleciones de 6 a 18 nucleótidos de longitud, comenzando aproximadamente en 8 pb hacia abajo del sitio PAM). Por lo tanto, los ensayos tendrán secuencias sonda que cubren esta zona que es delecionada por Cas12a. Por ejemplo, para Waxy1 se utilizó el ensayo 3686 (TQ2817): la sonda GGTTTCAGGTTTGGGAAAGA (SEQ ID NO:127) se solapa con la secuencia diana del ARNg GGGAAAGACCGAGAAGATCT (SEQ ID NO:128). En la Tabla 27 se muestran los restantes cebadores del ensayo.

Tabla 27. Vector 26258 Genes diana de edición del genoma Cas12a, secuencias de ARNg e ID del ensayo, secuencias de cebadores y sondas.

Nombr e de la diana	Secue ncia de ARNg	Ens ayo	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
<i>Opaque2</i>	<u>SEQ</u> <u>ID</u> <u>NO:</u> <u>172</u>	377 7	FE12949: ATCGA TCTGTCACTTGAT TTTAATTAGAA (SEQ ID NO: 183)	FE12950: GTGAGCGGCTTTC CTGTATCT (SEQ ID NO: 184)	FE12951: TCTGGCTGAT TCTCTATT (SEQ ID NO: 185)

Nombr e de la diana	Secue ncia de ARNg	Ens ayo	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
<i>Waxy1</i>	<u>SEQ</u> <u>ID</u> <u>NO:</u> <u>173</u>	368 6	FE12703: TGTAGTCCGTTCC AGCGACA (SEQ ID NO: 186)	FE12704: GGTTTCAGGTTTG GGGAAAGA (SEQ ID NO: 187)	FE12705: CCGTAGATCT TCTCCTC (SEQ ID NO: 188)
<i>Endos perm1 amari llo</i>	<u>SEQ</u> <u>ID</u> <u>NO:</u> <u>174</u>	378 0	FE12958: GCTGACTGGTCTC ACCATCTCAT (SEQ ID NO: 189)	FE12959: AGTAT GATGGCCATATAT TTGCTATCTTA (SEQ ID NO: 190)	FE12960: CTAAAGATGG TGGTGGTG (SEQ ID NO: 191)
<i>UPL (crom . 5)</i>	<u>SEQ</u> <u>ID</u> <u>NO:</u> <u>176</u>	377 8	FE12952: TGGGACATTTGGG AAGGAAA (SEQ ID NO: 192)	FE12953: GTCTAAGGGCCTG CTGACGA (SEQ ID NO: 193)	FE12954: CTGAAGGAAA CCTATCTC (SEQ ID NO: 194)

Nombr e de la diana	Secue ncia de ARNg	Ens ayo	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
<i>E3</i> <i>UPL2</i> (<i>crom</i> 2)	<u>SEQ</u> <u>ID</u> <u>NO:</u> <u>175</u>	377 9	FE12952: TGGGACATTGGG AAGGAAA (SEQ ID NO: 195)	FE12956: CTGACTGCCTGAT GACGCA (SEQ ID NO: 196)	FE12957: TTGGTATGTT TGCCTCAGA (SEQ ID NO: 197)

Se produjeron varios eventos T0 que tenían una sola copia de la inserción del ADN-T del vector Cas12a y que no tenían cadena principal, y estos eventos, junto con otros que tenían múltiples copias que incluían alguna cadena principal, se autopolinizaron para dar semillas T1. Las plantas T1 homocigotas para el ADN-T CRISPR (es decir, que se genotipificaron mediante ensayos TaqMan para determinar la cigosidad del transgén de edición del genoma, y que tenían al menos dos copias de la maquinaria de edición de Cas12a y del ARN guía transformadas de forma estable, con eventos de inserción simples o múltiples) se seleccionaron para ser autopolinizadas para generar semillas T2 (Tabla 28).

Tabla 28. Eventos representativos y sus datos Taqman en las líneas inductoras HI-Edit élite.

Evento	Línea	Vector	B	Wa	O	UP	UP	Cas1	BnB
--------	-------	--------	---	----	---	----	----	------	-----

			B	xy	2	L	L2	2a	BM
MZKE21121	20ALL1134V								
7A019A	K MM	26258	3	0	2	0	0	2	N/D
MZKE21121	20ALL1134V								
7A067A	K MM	26258	0	0	2	0	0	1	N/D
MZKE21121	20ALL1134V								
7A071A	K MM	26258	0	0	2	0	1	1	N/D
MZKE21121	20ALL1134V								
7A103A	K MM	26258	0	0	2	0	0	1	N/D
MZKE21121	20ALL1134V								
7A116A	K MM	26258	3	0	0	0	0	1	N/D
MZKE21121	20ALL1134V								
7A122A	K MM	26258	2	0	2	1	0	1	N/D
MZKE21121	20ALL1134V	26258;							
6A057A	G MM	24288	0	0	2	1	0	1	0
MZKE21121	20ALL1134V	26258;							
6A075A	G MM	24288	0	0	2	0	1	1	0
MZKE21140	20ALL1134V	26258;							
2B045A	L MM	24288	4	0	2	0	0	6	0

La columna denominada "BB" se refiere a la cadena principal de *Agrobacterium*; "O2" se refiere a Opaque2; "UPL2" se refiere a una supuesta proteína ubiquitina ligasa en el cromosoma 5; "UPL2" se refiere a *E3 ubiquitina ligasa2* en el cromosoma 2.

Las plantas T2 resultantes se fijan en homocigosis para la maquinaria de edición (ADN-T) (de nuevo, pueden ser de una o varias copias). En cualquiera de las generaciones T0 o T1 o T2, las plantas ADN-T+ se pueden cruzar con cualquier línea endogámica de maíz para realizar "HI-Edit". En este experimento, la semilla T2 se cruzará con una diversidad de variedades de maíz, incluyendo las líneas *stiff stalk* tales como NP2222 y SYN-INBD45 (una línea *non-stiff stalk iodent*), SYN-INBE56 (una línea *non-stiff stalk*), SYN-INBF67 (una línea *stiff stalk*), SYN-INBG78 (una línea *non-stiff stalk iodent*), SYN-INBH89 (una línea *non-stiff stalk iodent*), SYN-INBI90 (una línea *non-stiff stalk iodent*), SYN-INBJ13 (una línea de tipo Mo17 *non-stiff stalk*) y SYN-INBK14 (una línea tropical). Los haploides se identificarán y se ensayarán para ediciones de acuerdo con el proceso descrito en la (Patente de EE.UU. N.º 10,285,348; Kelliher, T. et al., One step genome editing of elite crop germplasm (2019) Nature Biotechnology 37(3):287-292). A continuación, las plantas haploides editadas del germoplasma templado, tropical, subtropical u otro se identificarán, se duplicarán y se cultivarán hasta la madurez y se autopolinizarán para generar semillas DH editadas (líneas editadas endogámicas puras) que se usarán para procesos adicionales de mejoramiento y producción de semillas. Todas las plantas y líneas de generación DH y DH1

se evaluarán para confirmar la existencia de ediciones homocigotas en el sitio diana y la falta del transgén CRISPR (que debería haberse eliminado durante el proceso de inducción de haploidía).

Debido a que todos estos eventos se obtienen de las nuevas líneas inductoras de haploidía fijadas para al menos *mat1*, el alelo *qhir8* HI y R1-SCM2, deberían tener una tasa de inducción de haploidía fuerte y, con la adición del transgén, deberían poder lograr un nivel eficiente de HI-Edit en muchas líneas de maíz. En este experimento, es factible realizar HI-Edit usando el polen de los eventos T0. Sin embargo, puede ser preferible realizar HI-Edit en las plantas homocigotas T1 y T2 porque en estas plantas, cada grano de polen portará la capacidad de HI-Edit: todas tendrán alelos inductores de haploidía para los genes/QTL y todas portarán un transgén CRISPR. Si se usa polen T0, aunque los locus inductores de haploidía estarán presentes en cada grano de polen, la maquinaria CRISPR no lo estará: para eventos T0 de una sola copia, solo el 50 % del polen tendrá el transgén CRISPR, y para eventos de dos copias o más, es probable que más del 50 % del polen tenga el transgén, dependiendo de la segregación.

Durante las polinizaciones HI-Edit, las líneas femeninas a editar son líneas inductoras no haploides (tienen alelos

homocigotos de tipo silvestre para MATL y locus *qhir8* y R1-SCM2 y carecen de transgenes de edición del genoma CRISPR-Cas). Los embriones de la progenie se extraerán de las espigas de polinización cruzada en placas de Petri en el laboratorio y a continuación se someterán a varios ensayos para determinar cuáles son haploides editados. La semilla de la progenie también puede crecer hasta la madurez, momento en el cual los haploides pueden identificarse examinando el color del embrión y a continuación germinar en el suelo. En el método de laboratorio planificado, los embriones se extraerán, se colocarán en placas y a continuación se calificarán como híbridos diploides si presentan el color púrpura (procedente de la acción del alelo R1-SCM2) o como haploides si son de color crema. Como alternativa, se pueden usar otros marcadores de color, tal como R1-nj. Véase, generalmente, Vijay Chaikam, et al. (2015), "Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression", Theor. Appl. Genet. 128(1):159-171. Esto se debe a que los híbridos diploides portan el alelo R1-SCM2 dominante de la línea donante de polen del inductor de haploidía masculino, mientras que los haploides solo están compuestos por un genoma materno y, por lo tanto, no tienen el alelo R1-SCM2 de la línea inductora

(es decir, falta el genoma masculino). Debido a que el rasgo R1-SCM2 se expresa en semillas e incluso en algunas partes de la planta, los haploides también pueden identificarse por la falta de color en el embrión en la etapa madura o en las etapas de plántula. En muchos casos, dependiendo de la cantidad de luz que recibieron la espiga y los granos en desarrollo durante la fase temprana de maduración de la semilla después de la polinización, los embriones híbridos diploides no se vuelven de color púrpura tras la extracción, pero deben exponerse a la luz entre 2 y 36 horas antes de que se vuelvan de color púrpura (la luz activa la vía de las antocianinas). Los embriones se extraerán 13-22 días después de la polinización (DAP, por sus siglas en inglés), aunque teóricamente es posible la extracción entre los 10-25 DAP, se expondrán a la luz durante 16 a 24 horas, se conservarán haploides; y los diploides serán descartados. Durante el tratamiento con luz, los embriones se pondrán en contacto con un agente duplicador cromosómico tal como colchicina (preferida), trifluralina u otro agente duplicador cromosómico. Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º US2004/0210959 de C.L. Armstrong et al., incorporada en el presente documento por referencia. Como alternativa, se puede aplicar un agente duplicador cromosómico a embriones aislados durante la germinación o a

plántulas de haploides germinadas en el suelo. En el experimento planificado, los supuestos embriones haploides (de color crema) se germinarán en Phytatrays y generarán raíces y hojas. Después de seis a catorce días de crecimiento, se tomarán pequeñas muestras de hojas para determinar cuáles de los supuestos haploides se editarán. De nuevo, se usarán ensayos TaqMan o ensayos de PCR típicos para evaluar si los sitios diana están editados en estos supuestos haploides. La presencia de mutaciones en el sitio diana se puede verificar mediante análisis de secuencias (secuenciación de ADN), análisis de marcadores o incluso fenotipo visual, dependiendo del gen diana. Dado que solo hay una copia del ADN para mutar en plantas haploides, fenotipos recesivos deben mostrar así que podría haber otra forma de identificar los haploides que fueron editados. Al mismo tiempo que se ejecutan los ensayos TaqMan para los sitios diana, los supuestos haploides se confirmarán como haploides verdaderos en virtud de los ensayos TaqMan diseñados para detectar el transgén de edición CRISPR-Cas y los marcadores inductores de haploidía del progenitor masculino: Los haploides verdaderos carecerán de todos estos genes o alelos (los marcadores aparecerán como de tipo silvestre o no presentes). La Tabla 29 muestra un ejemplo de un resultado de marcador haploide editado.

Tabla 29. Resultados de edición de ejemplo que indican resultados de genotipado para haploides, haploides editados y falsos haploides.

Crom.	1	1	9	9	10	10	ADN -T	AR Ng di an a	
Ensayo	SM7 252	SM7 246	SM4 849	SM09 56BQ	SM09 54BQ	SM09 53BQ	363 3	36 86	
Gen/QTL	<i>mat l</i>	<i>mat l</i>	<i>qhi r8</i>	<i>qhir 8</i>	R1- SCM2	R1- SCM2	Cas 12a	Wa xy	Determ inació n
Control diploide	DI	CG	AT	AG	AC	AG	1	0	diploi de
Supuesto haploide 2	DD	CC	GG	AA	AA	GG	0	2	haploi de
Supuesto haploide 3	DD	CC	GG	AA	AA	GG	0	2	haploi de
Supuesto haploide 4	DD	CC	GG	AA	AA	GG	0	0	haploi de editad o

Supuesto haploide 5	DD	CC	GG	AA	AA	GG	0	2	haploi de
Supuesto haploide 6	DI	CG	AG	AG	AC	AG	1	0	haploi de falso

Los supuestos haploides editados serán identificados por los ensayos del sitio diana que no amplifican el alelo WT tan fuertemente como un control no editado, es decir, los supuestos haploides editados darán un resultado "0" o "1" para el alelo de "tipo silvestre" en comparación con una lectura de "2 copias" para el control no editado. Al mismo tiempo, se espera que todos los haploides tengan genotipos homocigotos de tipo silvestre para MATL, *ghir8* y R1-SCM2 (ensayos de marcadores TaqMan SM7252 y SM4849 al menos), y serán "nulos" para el ensayo 3633 de Cas12a transgénico, lo que significa que no tienen los alelos inductores o la maquinaria de edición proporcionada por el progenitor masculino y, si están editados, que se editasen antes de la eliminación del genoma masculino y la inducción de haploidía.

En este experimento, también se espera que algunos de los embriones de color crema que se germinaron y se muestrearon para TaqMan sean falsos haploides, ya sea debido a la inhibición del color (es decir, el marcador R1-SCM2 no se expresa o el color púrpura no se desarrolla), la

eliminación parcial (incompleta) del genoma masculino (es decir, los embriones son quimeras o aneuploides que carecen parcialmente del ADN inductor) o la contaminación por polen (por autopolinización femenina u otro polen). Los embriones producidos por contaminación con polen no serán editados. Si se editan los haploides de falso positivo (basándose en el ensayo del sitio diana), tendrán un patrón distinto para otros ensayos (se amplificará el alelo inductor de *MATL*, *ghir8*, *R1-SCM2* o el transgén de ADN-T CRISPR) y, por lo tanto, se pueden identificar y separar de los haploides verdaderos editados.

El análisis de ploidía mediante citometría de flujo también se realizará en cualquier supuesta plántula haploide editada usando tejido foliar en un analizador de ploidía para confirmar el estado de la planta como haploide. En este momento, la planta puede ser potencialmente un haploide duplicado (debido a la duplicación espontánea o inducida del genoma), que en los resultados de la citometría de flujo se interpretaría como un diploide: por lo tanto, los marcadores genéticos son fundamentales para aclarar qué supuesto haploide (embriones de color crema) germina en plantas jóvenes que se editan pero carecen del genoma inductor y la maquinaria de edición: Estos son los haploides verdaderos editados.

Se espera que de mil embriones aislados de cada línea hembra "élite" de los cruces por el polen HI-Edit, aproximadamente 100 a 200 serán haploides, y entre estos haploides, entre 0 y 100 serán editados en los sitios diana del ARN guía. Típicamente, la eficiencia de la edición de haploides es menor que la de una planta transformada típica porque el transgén CRISPR y los complejos de proteína Cas-ARN guía están solo en el mismo núcleo que el genoma "élite" femenino durante un corto período de tiempo después de la fertilización pero antes de la eliminación natural del ADN inductor de haploidía durante la inducción de haploidía: la eliminación del genoma masculino puede tener lugar antes, durante o dentro de horas o días después de la fertilización. En esfuerzos anteriores de HI-Edit (véanse la Patente de EE.UU. N.º 10519456 de Q. Que y T. Kelliher, la Patente de EE.UU. N.º 10285348 Q. Que y T. Kelliher, y Kelliher, T. et al. 2019. One Step Genome Editing of Elite Crop Germplasm, Nature Biotechnology Volumen 37, páginas 287-292), se observó que las frecuencias de edición haploide estaban entre el 0 y el 10 % en el maíz.

Para determinar la naturaleza de las ediciones que se produjeron en el sitio diana del ARN guía de cada gen diana, los fragmentos de PCR de los ensayos TaqMan que den resultados positivos para la edición se subclonarán mediante

el uso de un kit TOPO Blunt IV disponible comercialmente, y al menos cuatro colonias para cada reacción de subclonación se secuenciarán usando secuenciación de Sanger con cebador directo e inverso. Se espera que se identifiquen pequeñas deleciones en los productos de PCR de plantas supuestamente editadas en el sitio de corte del ARN guía de Cas12a (partiendo de aproximadamente 8 a 10 pares de bases cadena abajo del sitio PAM), en comparación con la secuencia de tipo silvestre. También se pueden esperar ediciones en plantas que dieron un resultado TaqMan de "0 copias" (es decir, ninguna o muy poca amplificación del producto de PCR) para el sitio diana de ARN guía de interés. Se pueden ver algunos haploides con más de un sitio diana editado (véanse la Patente de EE.UU. N.º 10,285,348 y Kelliher, T. et al. 2019). Las ediciones serán analizadas para determinar el impacto en la secuencia de proteína predicha.

Ejemplo 3. Mejoramiento de líneas HI-NA usando la estrategia de retrocruzamiento

Se usará el mismo proceso que en el Ejemplo 1, excepto que en lugar de autofecundación para cada generación (F2, F3, F4, a F5), se usará el retrocruzamiento con los acervos transformables (por ejemplo, SYN-INBC34 o SYN-INBB23), en una o más etapas del proceso, para aumentar la proporción de estos genomas en las poblaciones reproductoras. Durante el

retrocruzamiento, los retrocruzamientos se realizarán entre esas líneas endogámicas (usándolas como plantas masculinas o femeninas) con plantas de población reproductora que porten al menos una copia de un alelo HI en cada uno de los locus inductores de haploidía fundamentales (*mat1*, *qhir8*, R1-SCM2 y opcionalmente el inhibidor de color). La selección asistida por marcadores (genotipado) se usará para seleccionar plantas heterocigotas para estos alelos (ya sea antes o después del cruce). Después del retrocruzamiento una o más veces, las líneas resultantes se cribarán de nuevo para el genotipo de estos alelos, y las plantas heterocigotas para todos los locus se autopolinizarán y a continuación se usará el genotipado una vez más para identificar aquellas plantas que son homocigotas para los alelos inductores de haploidía para la mayoría o todos esos locus. Se realizará una ronda adicional opcional de autopolinización para hacer que todos esos locus sean homocigotos, y a continuación las líneas resultantes (por ejemplo, BC2F3) se usarán para las pruebas de tasa de transformación y tasa de inducción de haploidía. Las líneas que tengan buen rendimiento en ambas evaluaciones de fenotipado se utilizarán para HI-Edit (por ejemplo, aquellas con una tasa de transformación >5 % y una HIR >12 %).

Ejemplo 4. Mejoramiento de líneas HI-NA tropicales o

subtropicales

Se usará el mismo proceso que se describe en los Ejemplos 1 y 3 para seleccionar una línea inductora de haploidía tropical transformable. Concretamente, una línea tropical o subtropical transformable de citotipo A (por ejemplo, SYN-INBA12) se cruzará como una planta femenina con polen donado de RWKS/Z21S//RWKS u otra línea inductora de haploidía. A continuación se generará una población F2 o BC1 (retrocruzamiento con la línea de citotipo A tropical) a partir de las plantas F1 que se generan en el cruce original. A continuación se empleará la selección asistida por marcadores, utilizando los ensayos de la Tabla 10, Tabla 11 y Tabla 12 (u otros ensayos de esas mismas regiones genómicas) para identificar y seleccionar F2 y/o BC1, BC2, F3 o plantas de generación posterior que comprenden *mat1*, el alelo *qhir8* HI y el alelo R1-SCM2 de la línea inductora de haploidía y, opcionalmente, el alelo de tipo silvestre para el locus inhibidor de color del cromosoma 9. En generaciones posteriores (por ejemplo, F4, F5, o BC1F3 o BC2F3, etc.) después de la fijación de los alelos inductores, se evaluará la tasa de transformación y la tasa de inducción de haploidía y se identificarán las líneas que tengan buen rendimiento en ambas evaluaciones de fenotipado (por ejemplo, aquellas con una tasa de transformación >5 % y una HIR >12 %). A

continuación, estas líneas se usarán para la transformación HI-Edit de casetes de edición del genoma Cas9 o Cas12; las líneas transformadas T0, T1, T2 o de generación posterior resultantes se usarán para cruzar con otras líneas tropicales, subtropicales o templadas (*stiff stalk* o *non-stiff stalk*) para inducir la inducción de haploidía y la edición simultánea del genoma (HI-Edit) como se describe en el Ejemplo 2 (por ejemplo, SYN-INBD45 (una línea *non-stiff stalk iodent*), SYN-INBE56 (una línea *non-stiff stalk*), SYN-INBF67 (una línea *stiff stalk*), SYN-INBG78 (una línea *non-stiff stalk iodent*), SYN-INBH89 (una línea *non-stiff stalk iodent*), SYN-INBI90 (una línea *non-stiff stalk iodent*), SYN-INBJ13 (una línea de tipo Mo17 *non-stiff stalk*), SYN-INBK14 (una línea tropical). A continuación, las plantas haploides tropicales o subtropicales u otras plantas de germoplasma editadas, se identificarán, se duplicarán y se cultivarán hasta la madurez para la autopolinización a fin de generar semillas DH editadas (líneas editadas endogámicas puras) que se usarán para procesos adicionales de mejoramiento y producción de semillas.

Ejemplo 5. Mejoramiento de líneas HI-NA sin seleccionar R1-SCM2 o el inhibidor de color del cromosoma 9

Se seguirá el mismo proceso que se describe en los Ejemplos 1, 3 y 4, excepto que en este caso, el gen R1-SCM2

(y el inhibidor de color del cromosoma 9) no se seleccionarán usando selección asistida por marcador; solo se seleccionarán los marcadores de alelo *mat1* y *qhir8* HI. Las líneas seleccionadas de F4, F5, F6 o BC3F2, BC4F2 o generaciones posteriores se transformarán con Cas9 o Cas12 u otro casete de edición del genoma que se usará para HI-Edit (con ARN guía diseñados para un rasgo diana) como en el Ejemplo 2, y contendrán un casete que codifica un marcador visible o fluorescente que se expresa en semillas o embriones: esto se usará para identificar haploides. Un ejemplo de un gen marcador es la proteína verde fluorescente o cualquier otra proteína fluorescente o marcador visible (tal como GUS) bajo el control de, por ejemplo, un promotor de zeína (que conferirá una expresión alta y específica en las semillas, como se describe, por ejemplo, en Y. Wu y J. Messing, 2012, Rapid Divergence of Prolamin Gene Promoters of Maize After Gene Amplification and Dispersal, *Genetics*, Vol. 192, 507-519).

Se observa que la elección de promotor que impulsa la expresión del sistema de proteínas de edición transformadas de forma estable puede tener un gran impacto sobre la tasa de edición en haploides. Por ejemplo, un promotor débil o un promotor inducible pueden no impulsar suficientemente la expresión del sistema de edición sin otros efectos

ambientales y, por lo tanto, en esos escenarios, la tasa de edición en los haploides puede ser baja. Se usará un promotor de caña de azúcar constitutivo (prSoUbi4), pero podrían ser más eficaces otros promotores que impulsen una expresión alta o específica en el saco embrionario, en el polen o en los espermatozoides (véase la Tabla 8 y la descripción adjunta anterior).

Ejemplo 6. Mejoramiento de líneas HI-NA a través del direccionamiento mutacional directo de MATL y DMP

Se usará el mismo proceso que se describe en los Ejemplos 1, 3 y 4, excepto que en este caso, solo se seleccionará el gen R1-SCM2 (y opcionalmente el inhibidor de color del cromosoma 9) usando la selección asistida por marcador, y a continuación las líneas seleccionadas se transforman y el genoma se edita usando casetes CRISPR dirigidos a los genes MATL y DMP que pueden conferir una HIR más alta (>7 %). Por lo tanto, el mejoramiento se simplifica enormemente: el objetivo del mejoramiento es simplemente introducir el marcador de color en el acervo transformable, y es probable que se obtengan altas tasas de transformación en la mayoría de los materiales vegetales introgresados. La ventaja es que este es un proceso de mejoramiento mucho más rápido y económico. Después de la generación de BC3F2, BC4F2 o generaciones posteriores, las líneas seleccionadas se

transforman con Cas9 o Cas12 u otro casete de edición del genoma que contiene ARN guía que están diseñados para inducir mutaciones desactivadas en los genes MATL y DMP usando uno de los ARN guía de la Tabla 30 (existen otros ARN guía que funcionarían aquí). Las plantas T0 con ediciones en ambos genes diana se identifican y se autopolinizan. La progenie de generación T1 o T2 o posterior que carece del transgén Cas pero que es homocigota para los alelos *matl* y *dmp* editados se identifican y se usan para confirmar la HIR alta (7 %-25 %) (utilizando el marcador de selección haploide el cambio de color R1-SCM2). Más tarde, la alta tasa de inducción y las líneas sumamente transformables se transforman con un nuevo casete de edición del genoma CRISPR que se usará para HI-Edit (con ARN guía diseñados para una diana de rasgo), como en el Ejemplo 2.

Tabla 30. ARN guía diseñados para desactivar los genes DMP y MATL.

AR Ng	Gen	ID B73_v4/v5 del maíz	Enzim a	Secuencia (5' a 3')	Siti o PAM
1	DMP	GRMZM2G465053	Cas12	CTCCCTGGGCACCTCGACGCCG	TTTC
2		/ Zm00001d04482 2	a Cas9	A (SEQ ID NO:165) GGCCGGGAGTAGCATCTCGA (SEQ ID NO:166)	AGG

3			Cas9	ACTACGGCTTCGTCACGCCG (SEQ ID NO:167)	CGG
4	MAT L	GRMZM2G471240	Cas12 a	CATGCAGAACTGCCCGCGCATC T (SEQ ID NO:168)	TTTA
5		/ Zm00001d02941	Cas9	GGGTCAACGTGGAGACAGGG (SEQ ID NO:169)	AGG
6		2	Cas9	CTTCCTGGAGGCCAGGCTGC (SEQ ID NO:170)	AGG

Ejemplo 7. Creación de líneas HI-NA sin mejoramiento

El inductor de haploidía RWKS/Z21S//RWKS BC1, o cualquier otra línea inductora de haploidía de alto rendimiento, se transformará usando la tecnología BBM o de transformación de líneas de élite relacionada como se describe en el Ejemplo 2 para suministrar transgenes CRISPR para los fines de HI-Edit. Todas las demás etapas en HI-Edit se realizarán como en el Ejemplo 2. La ventaja aquí es que no se necesita mejoramiento y las líneas inductoras de haploidía con mejor rendimiento (con todos los genes inductores y el marcador de color) pueden usarse directamente para HI-Edit. En este ejemplo, las líneas inductoras de haploidía a transformar no tienen un citotipo A normal y tienen una frecuencia de transformación de referencia inferior al 1 %. Como tal, se necesitará la tecnología BBM u otra tecnología impulsora de la transformación (véase el Ejemplo 2) para

conseguir una transformación suficiente de la línea inductora de haploidía de alto rendimiento.

Ejemplo 8. Creación de líneas HI-NA a través del direccionamiento mutacional directo de MATL y DMP y sin seleccionar R1-SCM2 o el inhibidor de color del cromosoma 9

Cualquier línea (que no sea una línea inductora de haploidía y que también carezca del marcador de color) se transformará con una primera construcción que comprende un casete de edición del genoma Cas9 o Cas12 y un casete de ARN guía diseñado para dirigirse a los genes MATRILINEAL y DMP (como en el Ejemplo 6). A continuación, esa línea se usará como una nueva línea HI-Edit. Se incluirán guías adicionales en la primera construcción que se pueden usar para HI-Edit o, preferentemente, se realizarán nuevas transformaciones en las líneas T1 o T2 mutantes *matl* y *dmp* libres de CRISPR (como en el Ejemplo 5) para incorporar nuevas construcciones de edición del genoma con el propósito de HI-Edit. De cualquier manera, las construcciones HI-Edit contendrán un casete que codifica un marcador visible o fluorescente que se expresa en semillas o embriones: este se usará para identificar haploides. La ventaja de este proceso es que se puede usar cualquier línea transformable para HI-Edit, siempre que se realicen las ediciones *matl* y *dmp* y siempre que se incluya un marcador transgénico para que los haploides puedan

identificarse fácilmente. Un ejemplo de un gen marcador es una proteína verde fluorescente bajo el control de un promotor de zeína (que conferirá una expresión alta y específica en las semillas) como se describe en el Ejemplo 5.

Todas las patentes, publicaciones de patente, solicitudes de patente, artículos de revistas, libros, referencias técnicas y similares que se analizan en la presente divulgación se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

Debe entenderse que las figuras y descripciones de la divulgación se han simplificado para ilustrar elementos que son relevantes para una comprensión clara de la divulgación. Debe apreciarse que las figuras se presentan con fines ilustrativos y no como dibujos de construcción. Los detalles omitidos y las modificaciones o realizaciones alternativas están dentro del alcance de los expertos en la materia.

Se puede apreciar que, en determinados aspectos de la divulgación, un solo componente puede ser reemplazado por múltiples componentes, y múltiples componentes pueden ser reemplazados por un solo componente, para proporcionar un elemento o estructura o para realizar una función o funciones determinadas. Excepto cuando dicha sustitución no sea operativa para practicar determinadas realizaciones de la divulgación, dicha sustitución se considera dentro del

alcance de la divulgación.

Los ejemplos presentados en el presente documento pretenden ilustrar implementaciones potenciales y específicas de la divulgación. Puede apreciarse que los ejemplos están destinados principalmente a fines ilustrativos de la divulgación para los expertos en la materia. Puede haber variaciones en estos diagramas o en las operaciones descritas en el presente documento sin apartarse del espíritu de la divulgación. Por ejemplo, en determinados casos, las etapas o las operaciones del método pueden realizarse o ejecutarse en un orden diferente, o pueden añadirse, eliminarse o modificarse operaciones.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que también se desvela específicamente cada valor intermedio, con respecto a la fracción más pequeña de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. Se abarca cualquier intervalo más estrecho entre cualquier valor establecido o valores intermedios no establecidos en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse de manera independiente en el intervalo, y cada intervalo en

donde ninguno de los dos límites, o ambos están incluidos en los intervalos más pequeños, también se incluye dentro de la tecnología, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, también se incluyen los intervalos que excluyen uno o ambos límites incluidos.

En la descripción anterior, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la materia que la invención descrita en esta divulgación puede ponerse en práctica sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito características y procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia para evitar complicar la invención. Se han descrito realizaciones de la divulgación con fines ilustrativos y no restrictivos. Aunque la presente invención se describe principalmente con referencia a realizaciones específicas, también se prevé que otras realizaciones serán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de la presente divulgación, y se pretende que dichas realizaciones estén contenidas dentro de los presentes métodos de la invención. Por consiguiente, la presente divulgación no se limita a las realizaciones descritas anteriormente o representadas en los dibujos, y se pueden

realizar diversas realizaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.