



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0819782-2 B1

(22) Data do Depósito: 25/11/2008

(45) Data de Concessão: 22/05/2018



* B R P I 0 8 1 9 7 8 2 B 1 *

(54) Título: MÉTODOS DE IDENTIFICAR UMA PLANTA DE MILHO COMPREENDENDO UM OU MAIS ALELOS ASSOCIADOS COM RESISTÊNCIA OU TOLERÂNCIA À PODRIDÃO DA ESPIGA POR DIPLODIA (DER) E INTROGRESSÃO DE UM LÓCUS DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO DA ESPIGA POR DIPLODIA (DER) EM UMA PLANTA DE MILHO

(51) Int.Cl.: C12Q 1/68; A01H 5/10

(30) Prioridade Unionista: 27/11/2007 US 60/990,413

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(72) Inventor(es): JOHANNES DANIEL ROSSOUW; HEYDER DINIZ SILVA; GILBERTO POZAR; MICHAEL R. KERNS; HUMBERTO GUTIERREZ; JUSTINO MARIO

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MÉTODOS DE IDENTIFICAR UMA PLANTA DE MILHO
COMPREENDENDO UM OU MAIS ALELOS ASSOCIADOS COM
RESISTÊNCIA OU TOLERÂNCIA À PODRIDÃO DA ESPIGA POR
DIPLODIA (DER) E INTROGRESSÃO DE UM LÓCUS DE
RESISTÊNCIA À PODRIDÃO DA ESPIGA POR DIPLODIA (DER) EM
UMA PLANTA DE MILHO".**

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade para o Pedido Provisório US 60/990.413, depositado em 27 de novembro de 2007, e incorporado aqui por referência em sua totalidade.

INCORPORAÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[002] Uma listagem de sequência é contida no arquivo nomeado "46_21(55528)B.txt" que é 53545 bytes (medidos em MS-Windows) e foi criada no dia 10 de novembro de 2008, compreende 79 sequências de nucleotídeo, e é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A presente invenção refere-se ao campo de melhoramento de planta e resistência à doença. Mais especificamente, a presente invenção inclui um método para melhoramento de plantas de milho contendo loci de traço quantitativo (QTL) que são associados com resistência à podridão da espiga por diplodia, uma doença fúngica associada à *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*. A invenção também inclui germoplasma e o uso de germoplasma contendo QTL que confere resistência à doença para introgressão no germoplasma elite em um programa de melhoramento para resistência à podridão da espiga por diplodia.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] Podridão da espiga por diplodia (DER) é uma doença fúngica difundida de milho causada pelos patógenos *Stenocarpella*

maydis e *Stenocarpella macrospora*. DER causa dano significativo às plantações com perda de rendimento e diminuição na qualidade do grão. Além disso, quando presente em alimentação animal *S. maydis* foi associada à diplodiose, um distúrbio nervoso do gado. DER foi problemática em muitos países incluindo os Estados Unidos, África do Sul, Brasil, Argentina, e México. Na África do Sul, *S. maydis* é o patógeno de podridão da espiga mais prevalente (Flett, B. B. e McLaren, N. W.; *Plant Disease* 78:587-589 (1994). Sintomas de DER incluem micélio fúngico branco iniciando na base de uma espiga de milho e pode cobrir a espiga inteira com picnídios na base do grão. Descoloração dos grãos é outro sintoma de DER que pode não ser evidente até que os grãos sejam removidos da espiga. Os sintomas não são frequentemente observáveis até que a espiga seja aberta. Triagem fenotípica para infecção de podridão da espiga é frequentemente difícil devido à necessidade para dar espigas da colheita. Estratégias de manejo da doença incluem tais métodos como rotação de culturas e aplicação de fungicida. Porém, resistência genética à DER é o método mais promissor de controlar a doença. Até agora, uma necessidade existe na técnica de desenvolver métodos melhorados para identificar e selecionar regiões genômicas associadas à tolerância ou resistência à DER para geneticamente desenvolver plantas resistentes à DER.

[005] Estudos mapearam QTL associados com resistência a outros patógenos de podridão da espiga tais como *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, os agentes causativos de podridão da espiga por *Fusarium* (Ali, M. L. et al., *Genome* 48: 521-533 (2005)), *Fusarium graminearum*, o agente causativo de podridão da espiga por *Giberella* (Robertson-Hoyt, L., *Crop Sci.* 46:1734-1743 (2006)), e *Aspergillus flavus*, o agente causativo de podridão da espiga por *Aspergillus* (Busboom, K. N. e White, D. G., *Amer.*

Phytopathological Soc. 94:1107-1115 (2004)). QTL associados com resistência à podridão da espiga por diplodia não foram descritos antes da data de prioridade deste pedido de patente.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A presente invenção fornece marcadores de QTL e de polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) associados com resistência à DER.

[007] Melhoramento de plantas de milho resistentes à DER pode ser grandemente facilitado pelo uso de seleção assistida com marcador. Das classes de marcadores genéticos, os polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) têm características que os tornam preferenciais para outros marcadores genéticos na detecção, seleção, e introgressão da resistência à doença em uma planta de milho. SNPs são preferidos porque tecnologias estão disponíveis para triagem de processamento alto, automatizada de marcadores de SNP, que pode diminuir o tempo para selecionar e causar introgressão da resistência à doença em plantas de milho. Também, marcadores de SNP são ideais porque a probabilidade que um alelo de SNP particular é derivado de origens independentes na população existente de uma espécie particular é muito baixa. Como tal, marcadores de SNP são úteis para rastrear e ajudar na introgressão de alelos de resistência à doença, particularmente no caso de haplótipos de resistência à doença.

[008] A presente invenção fornece e inclui um método para triar e selecionar uma planta de milho compreendendo um ou mais QTL associados com resistência à DER que foi derivado do mapeamento de populações que foram fenotipadas usando cepas endêmicas de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* e genotipadas usando tecnologia de marcador de polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP).

[0009] A presente invenção fornece um método de introgressão de um alelo em uma planta de milho compreendendo (a) cruzar pelo menos uma planta de milho resistente à DER com pelo menos uma segunda planta de milho para formar uma população, (b) genotipar com pelo menos uma segunda planta de milho na população com respeito a um marcador de ácido nucleico genômico de milho selecionado do grupo das SEQ ID NOs: 1 a 47, e (c) selecionar da população pelo menos uma planta de milho compreendendo pelo menos um genótipo que corresponde a uma planta de milho resistente à DER. Em certas modalidades deste método, a população formada, genotipada, e selecionada pode ser uma população segregante. A invenção também fornece uma planta de milho de elite produzida por tal método.

[0010] A genotipagem é realizada na etapa (b) determinando o estado alélico de pelo menos um dos marcadores de DNA genômico de milho. O estado alélico é determinado por um ensaio que é selecionado do grupo que consiste em extensão de base simples (SBE), sequenciamento da extensão de iniciador alelo-específica (ASPE), sequenciamento de DNA, sequenciamento de RNA, análises com base em microarranjo, PCR universal, extensão alelo-específica, hibridização, espectrometria de massa, ligação, extensão-ligação, e ensaios mediados por Endonuclease Flap.

[0011] A invenção também fornece um método de introgressão de um alelo em uma planta de milho compreendendo: (a) cruzar pelo menos uma planta de milho resistente à DER com pelo menos uma planta de milho sensível à DER para formar uma população; (b) triar a população com pelo menos um marcador de ácido nucleico para determinar se uma ou mais plantas de milho da população contêm um alelo de resistência à DER, em que o alelo de resistência à DER é um alelo selecionado do grupo que consiste em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou 24 loci de resistência à DER. Em certas modalidades deste método, a população formada, genotipada, e selecionada pode ser uma população segregante.

[0012] A invenção fornece uma planta de milho de elite obtida por tal método, a planta de milho compreendendo uma molécula de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1 à 47. A planta de milho de elite pode exibir um traço transgênico. Tal traço transgênico é selecionado do grupo que consiste em tolerância aos herbicidas, rendimento modificado, controle de insetos, resistência às doenças fúngicas, resistência aos vírus, resistência aos nematódeos, resistência às doenças bacterianas, resistência às doenças de micoplasma, produção de amido, modificação de amido, produção alta de óleo, produção modificada de óleo, conteúdo de ácido graxo modificado, produção alta de proteína, controle de germinação e de crescimento de muda, crescimento e desenvolvimento de planta, amadurecimento da fruta, nutrição intensificada animal e humana, rafinose baixa, resistência ao estresse ambiental, digestibilidade aumentada, enzimas industriais, peptídeos farmacêuticos e peptídeos e moléculas pequenas secretáveis, digestibilidade melhorada, produção de enzimas, produção de fibras, traços melhorados de processamento, sabor melhorado, fixação de nitrogênio, produção de semente híbrida, alergenicidade reduzida, biopolímeros, e biocombustíveis entre outros. Em um aspecto, a tolerância aos herbicidas é selecionada do grupo que consiste em herbicidas de glifosato, dicamba, glufosinato, sulfonilureia, bromoxinila e norflurazon. Estes traços podem ser fornecidos por métodos de biotecnologia de planta como transgenes em milho.

[0013] A invenção fornece uma molécula de ácido nucleico substancialmente purificada para a detecção de loci relacionados com

resistência à DER compreendendo uma molécula de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1 à 79 e complementos das mesmas.

[0014] A invenção também fornece ensaios para detectar loci de resistência à DER em uma planta de milho.

[0015] Métodos de identificar plantas de milho compreendendo pelo menos um alelo associado com resistência à podridão da espiga por diplodia (DER) são também fornecidos. Em certas modalidades destes métodos de identificar uma planta de milho compreendendo pelo menos um alelo associado com resistência à podridão da espiga por diplodia (DER) ou com tolerância à DER em uma planta de milho, compreendem os métodos: (a) genotipar pelo menos uma planta de milho com pelo menos um marcador de ácido nucleico genômico de milho selecionado do grupo das SEQ ID NOs: 1 -46, e 47, e (b) selecionar pelo menos uma planta de milho compreendendo um alelo de pelo menos um dos marcadores de ácido nucleico que são associados com resistência ou tolerância à DER. Em certas modalidades, a pelo menos uma planta de milho genotipada na etapa (a) e/ou a pelo menos uma planta de milho selecionada na etapa (b) é uma planta de milho de uma população gerada por um cruzamento. Em certas modalidades, genotipagem na etapa (b) pode ser com pelo menos cinco marcadores genômicos de ácido nucleico de milho selecionados do grupo das SEQ ID NOs: 1 a 47. Em certas modalidades, a uma ou mais plantas de milho selecionadas apresenta pelo menos tolerância a um fungo induzindo por DER ou exibe pelo menos resistência a um fungo indutor de DER. Em modalidades onde a população é gerada por um cruzamento, o cruzamento pode ser de pelo menos uma planta de milho resistente à DER com pelo menos uma planta de milho sensível à DER. Em ainda outras modalidades, os métodos podem também compreender a etapa (c) de ensaiar a planta

de milho selecionada para resistência a um fungo indutor de DER. Em ainda outras modalidades, os métodos podem também compreender a etapa de cruzar a planta de milho selecionada na etapa (b) com outra planta de milho. Em ainda outras modalidades, os métodos podem também compreender a etapa de obter semente da planta de milho selecionada na etapa (b). Em certas modalidades dos métodos, resistência ou tolerância é a um fungo indutor de DER selecionado do grupo que consiste em *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*.

[0016] Também fornecido aqui são plantas de milho obtidas por qualquer um destes métodos de identificar plantas de milho compreendendo pelo menos um alelo associado com resistência à podridão da espiga por diplodia (DER). Em certas modalidades, plantas de milho obtidas por estes métodos podem compreender um alelo de pelo menos uma molécula de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1 a 47 que está associada com resistência ou tolerância à DER, e em que a planta de milho apresenta pelo menos tolerância a um fungo indutor de DER ou pelo menos resistência a um fungo indutor de DER. Em certas modalidades, plantas de milho obtidas por estes métodos são plantas de milho de elite.

[0017] Métodos de introgressão de um locus de resistência à podridão da espiga por diplodia (DER) em uma planta de milho são também fornecidos. Em certas modalidades, estes métodos de introgressão de um locus de resistência à podridão da espiga por diplodia (DER) em uma planta de milho compreendem: (a) triar uma população com pelo menos um marcador de ácido nucleico para determinar se uma ou mais plantas de milho da população contêm um locus de resistência à podridão da espiga por diplodia (DER), em que o locus de resistência à DER é selecionado do grupo que consiste em

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou 24 loci resistentes à DER, e (b) selecionar da população a pelo menos uma planta de milho compreendendo um alelo do marcador associado ao locus de resistência à DER. Em certas modalidades destes métodos, pelo menos um dos marcadores é como fornecido na figura 1, 2, 3, 4, 5, 6, ou Tabela 10. Em certas modalidades destes métodos, pelo menos um dos marcadores fica localizado dentro de 5cM, 2cM, ou 1cM do alelo resistente. Em outras modalidades, pelo menos um dos marcadores fica localizado dentro de 2cM, ou 1cM do alelo resistente. Em certas modalidades destes métodos, pelo menos um dos marcadores fica localizado dentro de 100 Kb do alelo de resistência. Em outras modalidades, pelo menos um dos marcadores fica localizado dentro de 1 Mb, ou 1 Kb do alelo resistente. Em certas modalidades destes métodos, a população é uma população segregante. Em certas modalidades destes métodos, pelo menos um dos marcadores exibe uma contagem de LOD de mais que 2,0 com o locus de resistência à DER. Em outras modalidades, pelo menos um dos marcadores exibe uma contagem de LOD de mais que 3,0 ou mais que 4.0 com o locus de resistência à DER. Em certas modalidades destes métodos, pelo menos um dos marcadores é selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 1-46, e 47.

[0018] Também fornecido aqui são plantas de milho obtidas por qualquer um destes métodos de introgressão de um locus de resistência à podridão da espiga por diplodia (DER) em uma planta de milho. Em certas modalidades, uma planta de milho obtida por estes métodos pode compreender um alelo de pelo menos um marcador de ácido nucleico selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 1-46, e 47 que está associada com resistência à DER ou com tolerância à DER. Em certas modalidades, uma planta de milho obtida por estes métodos pode apresentar pelo menos tolerância a um fungo indutor de

DER. Em certas modalidades, uma planta de milho obtida por estes métodos pode apresentar pelo menos resistência a um fungo indutor de DER. Em certas modalidades, plantas de milho obtidas por estes métodos são pelo menos tolerantes ou pelo menos resistentes a um fungo indutor de DER selecionado do grupo que consiste em *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*.

[0019] Também fornecido são moléculas de ácido nucleico isolado para detectar um marcador molecular representando um polimorfismo em DNA de milho, em que a molécula de ácido nucleico compreende pelo menos 15 nucleotídeos que incluem ou são adjacentes ao polimorfismo, em que a molécula de ácido nucleico é pelo menos 90 por cento idêntica a uma sequência do mesmo número de nucleotídeos sucessivos em qualquer filamento de DNA que incluem ou são adjacentes ao polimorfismo, e em que o marcador molecular é selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1 a 47. Em certas modalidades, o ácido nucleico pode também compreender uma marcação detectável ou fornecer incorporação de uma marcação detectável. Em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico hibridar com pelo menos um alelo do marcador molecular sob condições de hibridização rigorosas. Em certas modalidades, o marcador molecular é SEQ ID NO: 27 e o ácido nucleico isolado é um oligonucleotídeo que é pelo menos 90% idêntico às SEQ ID NOs: 56, 57, 64, 65, 72, ou 73. Em certas modalidades, o marcador molecular é SEQ ID NO: 28 e o ácido nucleico é um oligonucleotídeo que é pelo menos 90% idêntico às SEQ ID NOs: 58, 59, 66, 67, 74, ou 75. Em certas modalidades, o marcador molecular é SEQ ID NO: 5 e o ácido nucleico é um oligonucleotídeo que é pelo menos 90% idêntico às SEQ ID NOs: 60, 61, 68, 69, 76, ou 77. Em certas modalidades, o marcador molecular é SEQ ID NO: 6 e o ácido nucleico é um oligonucleotídeo que é pelo menos 90% idêntico às SEQ ID NOs: 62,

63, 70, 71, 78, ou 79.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO

[0020] SEQ ID NO: 1 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 1.

[0021] SEQ ID NO: 2 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 1.

[0022] SEQ ID NO: 3 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 2.

[0023] SEQ ID NO: 4 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 2.

[0024] SEQ ID NO: 5 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 3.

[0025] SEQ ID NO: 6 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 3.

[0026] SEQ ID NO: 7 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 4.

[0027] SEQ ID NO: 8 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 5.

[0028] SEQ ID NO: 9 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 4.

[0029] SEQ ID NO: 10 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 5.

[0030] SEQ ID NO: 11 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 6.

[0031] SEQ ID NO: 12 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 6.

[0032] SEQ ID NO: 13 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 7.

[0033] SEQ ID NO: 14 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 7.

- [0034] SEQ ID NO: 15 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 8.
- [0035] SEQ ID NO: 16 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 8.
- [0036] SEQ ID NO: 17 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 9.
- [0037] SEQ ID NO: 18 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 10.
- [0038] SEQ ID NO: 19 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 9.
- [0039] SEQ ID NO: 20 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 10.
- [0040] SEQ ID NO: 21 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 11.
- [0041] SEQ ID NO: 22 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 12.
- [0042] SEQ ID NO: 23 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 11.
- [0043] SEQ ID NO: 24 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 12.
- [0044] SEQ ID NO: 25 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 13.
- [0045] SEQ ID NO: 26 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 13.
- [0046] SEQ ID NO: 27 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 14.
- [0047] SEQ ID NO: 28 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 14.
- [0048] SEQ ID NO: 29 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 15.

- [0049] SEQ ID NO: 30 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 16.
- [0050] SEQ ID NO: 31 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 15.
- [0051] SEQ ID NO: 32 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 16.
- [0052] SEQ ID NO: 33 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 17.
- [0053] SEQ ID NO: 34 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 17.
- [0054] SEQ ID NO: 35 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 18.
- [0055] SEQ ID NO: 36 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 19.
- [0056] SEQ ID NO: 37 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 18.
- [0057] SEQ ID NO: 38 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 20.
- [0058] SEQ ID NO: 39 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 20.
- [0059] SEQ ID NO: 40 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 21.
- [0060] SEQ ID NO: 41 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 21.
- [0061] SEQ ID NO: 42 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 22.
- [0062] SEQ ID NO: 43 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 22.
- [0063] SEQ ID NO: 44 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 23.

[0064] SEQ ID NO: 45 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 23.

[0065] SEQ ID NO: 46 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 24.

[0066] SEQ ID NO: 47 é uma sequência genômica derivada de *Zea mays* L associada com locus de resistência à DER 24.

[0067] SEQ ID NO: 48 é um iniciador de PCR direto para a amplificação da SEQ ID NO: 27.

[0068] SEQ ID NO: 49 é um iniciador de PCR reverso para a amplificação da SEQ ID NO: 27.

[0069] SEQ ID NO: 50 é um iniciador de PCR direto para a amplificação da SEQ ID NO: 28.

[0070] SEQ ID NO: 51 é um iniciador de PCR reverso para a amplificação da SEQ ID NO: 28.

[0071] SEQ ID NO: 52 é um iniciador de PCR direto para a amplificação da SEQ ID NO: 5.

[0072] SEQ ID NO: 53 é um iniciador de PCR reverso para a amplificação da SEQ ID NO: 5.

[0073] SEQ ID NO: 54 é um iniciador de PCR direto para a amplificação da SEQ ID NO: 6.

[0074] SEQ ID NO: 55 é um iniciador de PCR reverso para a amplificação da SEQ ID NO: 6.

[0075] SEQ ID NO: 56 é uma sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 27.

[0076] SEQ ID NO: 57 é uma segunda sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 27.

[0077] SEQ ID NO: 58 é uma sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 28.

[0078] SEQ ID NO: 59 é uma segunda sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 28.

- [0079] SEQ ID NO: 60 é uma sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 5.
- [0080] SEQ ID NO: 61 é uma segunda sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 5.
- [0081] SEQ ID NO: 62 é uma sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 6.
- [0082] SEQ ID NO: 63 é uma segunda sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 6.
- [0083] SEQ ID NO: 64 é uma terceira sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 27.
- [0084] SEQ ID NO: 65 é uma quarta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 27.
- [0085] SEQ ID NO: 66 é uma terceira sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 28.
- [0086] SEQ ID NO: 67 é uma quarta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 28.
- [0087] SEQ ID NO: 68 é uma terceira sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 5.
- [0088] SEQ ID NO: 69 é uma quarta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 5.
- [0089] SEQ ID NO: 70 é uma terceira sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 6.
- [0090] SEQ ID NO: 71 é uma quarta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 6.
- [0091] SEQ ID NO: 72 é uma quinta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 27.
- [0092] SEQ ID NO: 73 é uma sexta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 27.
- [0093] SEQ ID NO: 74 é uma quinta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 28.

[0094] SEQ ID NO: 75 é uma sexta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 28.

[0095] SEQ ID NO: 76 é uma quinta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 5.

[0096] SEQ ID NO: 77 é uma sexta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 5.

[0097] SEQ ID NO: 78 é uma quinta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 6.

[0098] SEQ ID NO: 79 é uma sexta sonda para a detecção do SNP da SEQ ID NO: 6.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0099] Os desenhos em anexo que são incorporados e formam uma parte do relatório descritivo, ilustram as modalidades da presente invenção e junto com a descrição, servem para explicar os princípios da invenção.

Nos desenhos:

[00100] figura 1: Exibe Loci de Resistência à DER associado com resistência à DER em CV183/CV174 + 01HGI4. Na coluna final que indica Geografia, SA é África do Sul, AR é Argentina, e EUA são os Estados Unidos da América.

[00101] figura 2: Exibições Loci de Resistência à DER (QTL) e marcadores de SNP associados com resistência à DER na população de CV128/CV162 no Brasil central.

[00102] figura 3: Exibições Loci de Resistência à DER (QTL) e marcadores de SNP associados com resistência à DER na população de CV128/CV162 no Brasil central. Dados eram de uma População de Mapeamento de CV128*2/CV162 no Brasil central com *S. macrospora*.

[00103] figura 4: Exibe Loci de Resistência à DER (QTL) e marcadores de SNP associados com resistência à DER na população de CV128/CV162 no Brasil central. Dados são para uma População de

Mapeamento de CV128*2/CV162 no Brasil central com *S. maydis*.

[00104] figura 5: Exibe Loci de Resistência (QTL) e marcadores de SNP associados com resistência à DER na população de mapeamento de CV162/CV129 +CV128 no Brasil central. Abaixo de "Efeito", "dom" representa "dominante".

[00105] figura 6: Exibe Loci de Resistência (QTL) e marcadores de SNP associados com resistência à DER na população de CV162/CV129 + CV128.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00106] As definições e métodos fornecidos definem a presente invenção e guiam aqueles versados na técnica na prática da presente invenção. A menos que do contrário observado, os termos são para ser entendidos de acordo com o uso convencional por aqueles versados na técnica relevante. Definições dos termos comuns em biologia molecular podem também ser encontradas em Alberts et al., *Molecular Biology of The Cell*, 5ª Edition, Garland Science Publishing, Inc.: Nova Iorque, 2007; Rieger et al., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5ª edition, Springer-Verlag: Nova Iorque, 1991; King et al., *A Dictionary of Genetics*, 6ª ed, Oxford University Press: Nova Iorque, 2002; e Lewin, *Genes IX*, Oxford University Press: Nova Iorque, 2007. A nomenclatura para bases de DNA como expostas em 37 CFR § 1.822 é usada.

[00107] Como aqui usado, "alelo de resistência" significa a sequência de ácido nucleico isolado que inclui o alelo polimórfico associado com resistência à *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*.

[00108] Um "alelo" refere-se a uma sequência alternativa em um locus particular; o comprimento de um alelo pode ser tão pequeno quanto 1 base de nucleotídeo, mas é tipicamente maior. Sequência alélica pode ser sequência de aminoácido ou sequência de ácido

nucleico.

[00109] Um "locus" é uma sequência curta que é usualmente única e usualmente encontrada em uma localização particular no genoma por um ponto de referência; por exemplo, uma sequência de DNA curta sendo um gene, ou parte de um gene ou região intergênica. Um locus desta invenção pode ser um produto de PCR único em uma localização particular no genoma. Os loci desta invenção compreendem um ou mais polimorfismos; isto é, alelos alternativos presentes em alguns indivíduos.

[00110] Como aqui usado, "polimorfismo" significa a presença de uma ou mais variações de uma sequência de ácido nucleico em um ou mais loci em uma população de um ou mais indivíduos. A variação pode compreender, mas não é limitada a uma ou mais alterações de base, a inserção de um ou mais nucleotídeos ou a deleção de um ou mais nucleotídeos. Um polimorfismo inclui um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP), uma repetição de sequência simples (SSR) e indels que são inserções e deleções. Um polimorfismo pode surgir de processos aleatórios em replicação de ácido nucleico, através de mutagênese, como resultado dos elementos genômicos móveis, da variação de número de cópias e durante o processo de meiose, tal como cruzamento desigual, duplicação de genoma e quebras e fusões de cromossomo. A variação pode ser comumente encontrada ou existir em baixa frequência dentro de uma população, a primeira tendo maior utilidade em melhoramento de planta geral e a última pode ser associada com variação fenotípica rara, mas importante.

[00111] Como aqui usado, "marcador" significa uma sequência de ácido nucleico polimórfico ou característica de ácido nucleico. Um "polimorfismo" é uma variação entre indivíduos na sequência, particularmente na sequência de DNA, ou característica, tal como um

perfil transcricional ou padrão de metilação. Polimorfismos úteis incluem polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs), inserções ou deleções em sequência de DNA (Indels), repetições de sequência simples de sequência de DNA (SSRs), um polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição, um haplótipo, e um SNP de marcador. Um marcador genético, um gene, uma sequência derivada de DNA, uma sequência derivada de RNA, um promotor, uma região não transladada de 5' de um gene, uma região não transladada de 3' de um gene, microRNA, siRNA, uns QTL, um marcador de satélite, um transgene, mRNA, dsRNA, um perfil transcricional, e um padrão de metilação podem compreender polimorfismos. Em um aspecto mais vasto, um "marcador" pode ser uma característica detectável que pode ser usada para discriminar entre as diferenças hereditárias entre os organismos. Exemplos de tais características podem incluir marcadores genéticos, composição de proteína, níveis de proteína, composição de óleo, níveis de óleo, composição de carboidrato, níveis de carboidrato, composição de ácido graxo, níveis de ácido graxo, composição de aminoácido, níveis de aminoácido, biopolímeros, farmacêuticos, composição de amido, níveis de amido, amido fermentável, rendimento de fermentação, eficiência de fermentação, rendimento de energia, compostos secundários, metabólitos, características morfológicas, e características agronômicas.

[00112] Como aqui usado, "ensaio de marcador" significa um método para detectar um polimorfismo em um locus particular usando um método particular, por exemplo medição de pelo menos um fenótipo (tal como cor da semente, cor da flor, ou outro traço visualmente detectável), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), extensão de base simples, eletroforese, alinhamento de sequência, hibridização de oligonucleotídeo específica alélica (ASO), DNA polimórfico amplificado randômico (RAPD),

tecnologias com base em microarranjo, e tecnologias de sequenciamento de ácido nucleico, etc.

[00113] Como aqui usado, "tipagem" refere-se a qualquer método por meio do qual a forma alélica específica de um polimorfismo genômico de milho dado é determinada. Por exemplo, um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) é submetido à tipagem determinando qual nucleotídeo está presente (isto é, um UM, G, T, ou C). Inserções/deleções (Indels) são determinadas determinando se o Indel está presente. Indels podem ser submetidos à tipagem por uma variedade de ensaios incluindo, mas não limitados a, ensaios de marcador.

[00114] Como aqui usado, a frase "adjacente", quando usada para descrever uma molécula de ácido nucleico que hibrida com o DNA contendo um polimorfismo, refere-se a um ácido nucleico que hibrida com as sequências de DNA que diretamente tocam a posição da base do nucleotídeo polimórfico. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico que pode ser usada em um ensaio de extensão de base simples é "adjacente" ao polimorfismo.

[00115] Como aqui usado, "posição de interrogação" refere-se a uma posição física em um suporte sólido que pode ser consultado para obter dados de genotipagem para um ou mais polimorfismos genômicos predeterminados.

[00116] Como aqui usado, "sequência de consenso" refere-se a uma sequência de DNA construída que identifica polimorfismos SNP e Indel em alelos em um local. Sequência de consenso pode ser com base em qualquer filamento de DNA no locus e estabelece a base de nucleotídeo de qualquer um dos dois de cada SNP no locus e as bases de nucleotídeo de todo as Indels no local. Desse modo, embora uma sequência de consenso possa não ser uma cópia de uma sequência de DNA atual, uma sequência de consenso é útil para

precisamente modelar os iniciadores e sondas para os polimorfismos atuais no local.

[00117] Como aqui usado, o termo "polimorfismo de nucleotídeo simples", também referido pela abreviação "SNP", significa um polimorfismo em um sítio simples em que o polimorfismo constitui uma alteração de par de base simples, uma inserção de um ou mais pares de base, ou uma deleção de um ou mais pares de base.

[00118] Como aqui usado, "genótipo" significa o componente genético do fenótipo e pode ser caracterizado indiretamente usando marcadores ou diretamente caracterizado por sequenciamento de ácido nucleico. Marcadores adequados incluem um caractere fenotípico, um perfil metabólico, um marcador genético, ou algum outro tipo de marcador. Um genótipo pode constituir um alelo para pelo menos um locus de marcador genético ou um haplótipo para pelo menos uma janela de haplótipo. Em algumas modalidades, um genótipo pode representar um locus simples e em outras pode representar um conjunto de loci amplo em genoma. Em outra modalidade, o genótipo pode refletir a sequência de uma porção de um cromossomo, um cromossomo inteiro, uma porção do genoma, e o genoma inteiro.

[00119] Como aqui usado, "fenótipo" significa as características detectáveis de uma célula ou organismo que são uma manifestação da expressão gênica.

[00120] Como aqui usado, "ligação" refere-se à frequência relativa na qual tipos de gametas são produzidos em um cruzamento. Por exemplo, se o locus A tem genes "A" ou "a" e locus B tem genes "B" ou "b" e um cruzamento entre pai I com AABB e pai B com aabb produziria quatro possíveis gametas onde os genes são segregados em AB, Ab, aB e ab. A expectativa nula é que haverá segregação igual independente em cada um dos quatro possíveis genótipos, isto é, sem

ligação $\frac{1}{4}$ dos gametas vai de cada genótipo. Segregação dos gametas em uns genótipos diferindo de $\frac{1}{4}$ é atribuída à ligação.

[00121] Como aqui usado, "desequilíbrio de ligação" é definido no contexto da frequência relativa dos tipos de gameta em uma população de muitos indivíduos em uma geração simples. Se a frequência de alelo A for p, a for p', B for q e b for q', então a frequência esperada (sem desequilíbrio de ligação) do genótipo AB é pq, Ab é pq', aB é p'q e ab é p'q'. Qualquer desvio da frequência esperada é chamado desequilíbrio de ligação. Dois loci são para ser "geneticamente ligados" quando eles estiverem em desequilíbrio de ligação.

[00122] Como aqui usado, "loci de traço quantitativo (QTL)" significa um locus que controla até certo ponto traços numericamente representáveis que usualmente são distribuídos continuamente.

[00123] Como aqui usado, o termo "endogâmico" significa uma linhagem que foi melhorada para homogeneidade genética.

[00124] Como aqui usado, o termo "híbrido" significa uma progênie de acasalamento entre pelo menos dois pais geneticamente dissimilares. Sem limitação, exemplos de acasalamento incluem esquemas de cruzamento simples, cruzamento simples modificado, cruzamento simples modificado duplo, cruzamento de três modos, cruzamento de três modos modificado, e cruzamento duplo em que pelo menos um pai em um cruzamento modificado é a progênie de um cruzamento entre as linhagens-irmãs.

[00125] Como aqui usado, o termo "testador" significa que uma linhagem usada em um cruzamento de teste com outra linhagem em que o testador e as linhagens testadas são de fundos gerais de germoplasmas diferentes. Um testador pode ser isogênico ou não isogênico.

[00126] Como aqui usado, o termo "milho" significa *Zea mays* ou

milho e inclui todas as variedades de planta que podem ser melhoradas com milho, incluindo espécies selvagens de milho.

[00127] Como aqui usado, o termo "compreendendo" significa "incluindo mas não limitado".

[00128] Como aqui usado, o termo "linhagem de elite" significa qualquer linhagem que foi o resultado do melhoramento e seleção para desempenho agrônômico superior. Uma planta de elite é qualquer planta de uma linhagem de elite.

[00129] Até ao ponto que quaisquer das definições precedentes são incompatíveis com as definições fornecidas em qualquer referência de patente ou de não patente incorporada aqui ou em qualquer referência encontrada em outro lugar, é entendido que a definição precedente será aqui usada.

[00130] Em geral, estas composições e métodos podem ser usados para genotipar plantas de milho do gênero *Zea*. Mais especificamente, plantas de milho da espécie *Zea mays* e da subespécie *Zea mays* L. ssp. *Mays* podem ser genotipadas usando estas composições e métodos. Em um aspecto adicional, a planta de milho é do grupo *Zea mays* L. subsp. *mays* Indentata, do contrário conhecida como milho dentado. Em outro aspecto, a planta de milho é do grupo *Zea mays* L. subsp. *mays* Indurata, do contrário conhecido como milho duro. Em outro aspecto, a planta de milho é do grupo *Zea mays* L. subsp. *mays* Saccharata, do contrário conhecido como milho verde. Em outro aspecto, a planta de milho é do grupo *Zea mays* L. subsp. *mays* Amylacea, do contrário conhecido como milho farinha. Em um outro aspecto, a planta de milho é do grupo *Zea mays* L. subsp. *mays* Everta, do contrário conhecido como milho pipoca. *Zea* ou plantas de milho que podem ser genotipadas com as composições e métodos descritos aqui incluem híbridos, endogâmicas, endogâmicas parciais, ou membros de populações definidas ou indefinidas.

[00131] Plantas da presente invenção podem ser uma planta de milho que é muito resistente, resistente, substancialmente resistente, meio resistente, comparativamente resistente, parcialmente resistente, meio suscetível, ou suscetível.

[00132] Em um aspecto preferido, a presente invenção fornece uma planta de milho para ser ensaiada para resistência ou suscetibilidade à DER por qualquer método para determinar se uma planta de milho é muito resistente, resistente, substancialmente resistente, meio resistente, comparativamente resistente, parcialmente resistente, meio suscetível, ou suscetível.

[00133] As plantas são artificialmente inoculadas com uma mistura contendo isolados de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* ou isolados de qualquer patógeno. Métodos de inoculação incluem deposição de esporos fúngicos no pedúnculo, o método de verticilo (Flett e McLaren; *Plant Disease* 78:587-589 (1994); Bensch, M. J., *S. Afr. J. Plant Soil* 12: 172-174), e o método de acordo com Chambers (*Plant Disease* 72:529-531 (1988)), Klapproth e Hawk (*Plant Disease* 75: 1057-1060 (1991), e Villena (1969). Fenotipagem para DER é feita pelos métodos a seguir. Resistência ou suscetibilidade é determinada após colher as espigas com as mãos. Em um método, a porcentagem de espigas podres das espigas totais é calculada em um diagrama e usada como dados fenotípicos. Em outro método, as espigas são descascadas após colher. Peso de grão total e peso de grão podre são determinados. Porcentagem de grão podre é depois usada como dados fenotípicos.

[00134] Em outro aspecto, a planta de milho pode mostrar uma resistência comparativa comparada a uma planta de milho de controle não resistente. Neste aspecto, uma planta de milho de controle preferivelmente será geneticamente similar com exceção do alelo de resistência à DER ou alelos em questão. Tais plantas podem ser

crescidas sob condições similares com exposição equivalente ou quase equivalente ao patógeno.

[00135] Uns QTL de resistência à doença da presente invenção podem ser introduzidos em uma linhagem endogâmica do milho de elite. Uma "linhagem de elite" é qualquer linhagem que foi o resultado do melhoramento e seleção para desempenho agrônômico superior.

[00136] Uns ATL de resistência à DER da presente invenção podem também ser introduzidos em uma planta de milho de elite compreendendo um ou mais transgenes que confere tolerância a herbicidas, rendimento aumentado, controle de insetos, resistência à doença fúngica, resistência viral, resistência a nematódeos, resistência à doença bacteriana, resistência à doença de micoplasma, produção de óleos modificada, produção de óleo alta, produção de proteína alta, controle de germinação e de crescimento de muda, nutrição intensificada animal e humana, rafinose baixa, resistência ao estresse ambiental, digestibilidade aumentada, enzimas industriais, proteínas farmacêuticas, peptídeos e moléculas pequenas, traços de processamento melhorados, sabor melhorado, fixação de nitrogênio, produção de semente híbrida, alergenicidade reduzida, biopolímeros, e biocombustíveis entre outros. Em um aspecto, a tolerância a herbicidas é selecionada do grupo que consiste em herbicidas de glifosato, dicamba, glufosinato, sulfonilureia, bromoxinil e norflurazon. Estes traços podem ser fornecidos por métodos de biotecnologia de planta como transgenes em milho.

[00137] Um alelo ou alelos de QTL de resistência à doença podem ser introduzidos de qualquer planta contendo aquele alelo (o doador) para qualquer planta de milho recipiente. Em um aspecto, a planta de milho recipiente pode conter loci de resistência à DER adicionais. Em outro aspecto, a planta de milho recipiente pode conter um transgene. Em outro aspecto, enquanto mantendo os QTL introduzidos, a

contribuição genética da planta que fornece os QTL de resistência à doença pode ser reduzida mediante retrocruzamento ou outras abordagens adequadas. Em um aspecto, o material genético nuclear derivado do material do doador na planta de milho pode ser menos ou cerca de 50%, menos ou cerca de 25%, menos ou cerca de 13%, menos ou cerca de 5%, 3%, 2% ou 1%, mas que o material genético contenha o locus ou loci de resistência à DER de interesse.

[00138] É também entendido que uma planta de milho da presente invenção pode exibir as características de qualquer grupo de maturidade relativa. Em um aspecto, o grupo de maturidade é selecionado do grupo que consiste em RM90-95, RM 95-100, RM 100-105, RM 105-110, RM 110-115, e RM 115-120.

[00139] Um alelo de uns QTL pode, claro, compreender genes múltiplos ou outros fatores genéticos mesmo dentro de uma região genômica contígua ou grupo de ligação, tal como um haplótipo. Como aqui usado, um alelo de um locus de resistência à doença pode abranger mais de um gene ou outro fator genético, portanto, onde cada gene individual ou componente genético é também capaz de exibir variação alélica e onde cada gene ou fator genético é também capaz de suscitar um efeito fenotípico no traço quantitativo em questão. Em um aspecto da presente invenção o alelo de uns QTL compreende um ou mais genes ou outros fatores genéticos que são também capazes de exibir variação alélica. O uso do termo "um alelo de uns QTL" é desse modo não intencionado a excluir uns QTL compreendendo mais de um gene ou outro fator genético. Especificamente, um "alelo de uns QTL" na presente invenção pode denotar um haplótipo dentro de uma janela de haplótipo em que um fenótipo pode ser resistência à doença. Uma janela de haplótipo é uma região genômica contígua que pode ser definida, e rastreada, com um conjunto de um ou mais marcadores polimórficos em que os

polimorfismos indicam identidade por descendência. Um haplótipo dentro daquela janela pode ser definido pela impressão digital dos alelos em cada marcador. Como aqui usado, um alelo é uma das várias formas de alternativas de um gene que ocupa um locus dado em um cromossomo. Quando todos os alelos presentes em um locus dado em um cromossomo forem iguais, aquela planta é homozigota para aquele local. Se os alelos presentes em um locus dado em um cromossomo diferirem, aquela planta é heterozigota para aquele local. Plantas da presente invenção podem ser homozigotas ou heterozigotas em qualquer locus de DER particular ou para um marcador polimórfico particular.

[00140] A presente invenção também fornece partes das plantas da presente invenção. Partes das plantas, sem limitação, incluem semente, endosperma, óvulo e pólen. Em um aspecto particularmente preferido da presente invenção, a parte das plantas é uma semente.

[00141] A presente invenção também fornece um recipiente de milho em que mais que 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou 99% das sementes compreendendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou 24 loci de resistência à DER. O recipiente de sementes de milho pode conter qualquer número, peso, ou volume de sementes. Por exemplo, um recipiente pode conter pelo menos, ou mais que, cerca de 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 80, 90, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 ou mais sementes. Em outro aspecto, um recipiente pode conter cerca de, ou mais que cerca de, 1 grama, 5 gramas, 10 gramas, 15 gramas, 20 gramas, 25 gramas, 50 gramas, 100 gramas, 250 gramas, 500 gramas, ou 1000 gramas de sementes. Alternativamente, o recipiente pode conter pelo menos, ou mais que, cerca de 0 g (0 onça), 28,3 g (1 onça), 141,7 g (5 onças), 283,5 g (10 onças), 0,5 kg (1 libra), 0,9 kg (2 libras), 1,4 kg (3 libras), 1,8 kg (4 libras), 2,3 kg (5 libras), 4,5 kg (10

libras), 6,9 kg (15 libras), 9,1 kg (20 libras), 11,3 kg (25 libras), ou 22,7 kg (50 libras) ou mais sementes.

[00142] Recipientes de sementes de milho podem ser qualquer recipiente disponível na técnica. Por exemplo, um recipiente pode ser uma caixa, um saco, uma lata, um pacote, uma bolsa, um rolo de fita, um balde, ou um tubo.

[00143] Em outro aspecto, as sementes contidas nos recipientes de sementes de milho podem ser sementes de milho tratadas ou sem tratar. Em um aspecto, as sementes podem ser tratadas para melhorar a germinação, por exemplo, preparando as sementes, ou através de desinfecção para proteger contra patógenos de sementes. Em outro aspecto, as sementes podem ser revestidas com qualquer revestimento disponível para melhorar, por exemplo, a plantabilidade, aparecimento de sementes, e proteção contra patógenos de sementes. Revestimento de semente pode ser qualquer forma de revestimento de semente incluindo, mas não limitadas a, peletização, revestimento de filme, e incrustações.

[00144] Plantas ou partes das mesmas da presente invenção podem também ser crescidas em cultura e regeneradas. Métodos para a regeneração de plantas de *Zea mays* de vários tipos de tecido e métodos para o cultivo de tecido de *Zea mays* são conhecidos na técnica (por exemplo, Bhaskaran et al., 1990 Crop Sci. 30:1328-1336). Técnicas de regeneração para plantas tais como *Zea mays* podem usar como o material de partida uma variedade de tipos de tecido ou de célula. Com *Zea mays*, em particular, processos de regeneração foram desenvolvidos que começam com certos tipos de tecidos diferenciados tais como meristemas, (Sairam et al., 2003 Genome 46:323-3). Regeneração de plantas de *Zea mays* maduras de cultura de tecido através de organogênese e embriogênese foi também relatado (Wang 1987 Plant Cell. Rep. 6:360-362; Chang 1983 Plant

Cell. Rep. 2:18-185; Green et al., 1975 Crop Sci. 15:417-421). Recentemente, regeneração de milho de sementes partidas foi também relatado (Al-Abed et al., 2006 Planta 223:1355-1366).

[00145] A presente invenção também fornece uma planta de milho resistente a doenças selecionada triando para resistência ou suscetibilidade à doença na planta de milho, a seleção compreendendo interrogar ácidos nucleicos genômicos para a presença de uma molécula de marcador que está ligada geneticamente a um alelo de uns QTL associados com resistência à doença na planta de milho onde o alelo de uns QTL está também localizado em um grupo de ligação associado com resistência à DER.

[00146] A presente invenção fornece um método de introgressão de um alelo associado com resistência à podridão da espiga por diplodia (DER) em uma planta de milho compreendendo (a) cruzar pelo menos uma planta de milho resistente à DER com pelo menos uma segunda planta de milho para formar uma população, (b) genotipar com pelo menos uma segunda planta de milho na população com respeito a um marcador de ácido nucleico genômico de milho selecionado do grupo das SEQ ID NOs: 1 à 47, e (c) selecionar da população a pelo menos uma planta de milho compreendendo pelo menos um genótipo que corresponde a uma planta de milho resistente à DER.

[00147] A presente invenção também inclui um método de introgressão de um alelo em uma planta de milho compreendendo: (a) cruzar pelo menos uma planta de milho resistente à DER com pelo menos uma planta de milho sensível à DER para formar uma população; (b) triar a população com um ou mais marcadores de ácido nucleico para determinar se uma ou mais plantas de milho da população contêm um alelo de resistência à DER, em que o alelo de resistência à DER é um alelo selecionado do grupo que consiste em locus de resistência à DER 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,

15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou locus de resistência à DER 24. Em certas modalidades, estes métodos podem também compreender a etapa de selecionar uma planta compreendendo um ou mais loci de resistência à DER selecionados do grupo que consiste em locus de resistência à DER 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou locus de resistência à DER 24.

[00148] A presente invenção inclui moléculas de ácido nucleico isolados. Tais moléculas incluem aquelas moléculas de ácido nucleico capazes de detectar genética ou fisicamente um polimorfismo ligado a um locus de resistência à DER. Tais moléculas podem ser referidas como marcadores. Marcadores adicionais podem ser obtidos que são ligados ao locus de resistência à DER 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou 24 através das técnicas disponíveis. Em um aspecto, a molécula de ácido nucleico é capaz de detectar a presença ou ausência de um marcador localizado menos que 30, 20, 10, 5, 2, ou 1 centiMorgan de um locus de resistência à DER. As moléculas de ácido nucleico exemplares com posições de mapa correspondentes são fornecidas no pedido de patente U. S. 2005/0218305 e pedidos de patente U. S. 11/504.538 e 60/930.609. Em outro aspecto, um marcador exibe uma contagem de LOD de 2 ou mais, 3 ou mais, ou 4 ou mais com DER, medindo usando Qgene[®] Versão 2.23 (Department of Plant Breeding and Biometry, 266 Emerson Hall, Cornell University, Ithaca, NY, 1996) e parâmetros predefinidos. Em outro aspecto, a molécula de ácido nucleico é capaz de detectar um marcador em um locus selecionado do grupo de locus de resistência à DER 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou 24. Em um outro aspecto, uma molécula de ácido nucleico é selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 à SEQ ID NO: 79, fragmentos das mesmas, complementos das mesmas, e moléculas de ácido nucleico capazes

de especificamente hibridar com uma ou mais destas moléculas de ácido nucleico.

[00149] Em um aspecto preferido, uma molécula de ácido nucleico da presente invenção inclui aquelas que especificamente hibridam com uma ou mais das moléculas de ácido nucleico expostas na SEQ ID NO: 1 à SEQ ID NO: 79 ou complemento das mesmas ou fragmentos de uma ou outra ou sob condições moderadamente rigorosas, por exemplo em cerca de 2,0 x SSC e cerca de 65°C. Em um aspecto particularmente preferido, um ácido nucleico da presente invenção especificamente hibrida com uma ou mais das moléculas de ácido nucleico expostas na SEQ ID NO: 1 à SEQ ID NO: 79 ou complementos ou fragmentos ou sob condições de severidade altas. Em um aspecto da presente invenção, uma molécula de ácido nucleico de marcador preferida da presente invenção tem a sequência de ácido nucleico exposta na SEQ ID NO: 1 à SEQ ID NO: 79 ou complemento das mesmas ou fragmentos de uma ou outra. Em outro aspecto da presente invenção, uma molécula de ácido nucleico de marcador preferida da presente invenção compartilha entre 80% e 100% ou 90% e 100% de identidade de sequência com as sequências de ácido nucleico expostas na SEQ ID NO: 1 à SEQ ID NO: 79 ou complemento das mesmas ou fragmentos de uma ou outra. Em um outro aspecto da presente invenção, uma molécula de ácido nucleico de marcador preferida da presente invenção compartilha entre 95% e 100% de identidade de sequência com as sequências expostas na SEQ ID NO: 1 à SEQ ID NO: 79 ou complemento das mesmas ou fragmentos de uma ou outra. Em um aspecto mais preferido da presente invenção, uma molécula de ácido nucleico de marcador preferida da presente invenção compartilha entre 98% e 100% de identidade de sequência com a sequência de ácido nucleico exposta na SEQ ID NO: 1 à SEQ ID NO: 79 ou complemento das mesmas ou fragmentos de uma ou

outra.

[00150] Moléculas de ácido nucleico ou fragmentos das mesmas são capazes de especificamente hibridar com outras moléculas de ácido nucleico sob certas circunstâncias. Como aqui usado, duas moléculas de ácido nucleico são capazes de especificamente hibridar uma com a outra se as duas moléculas forem capazes de formar uma estrutura de ácido nucleico antiparalela, dupla fita. Uma molécula de ácido nucleico é o "complemento" de outra molécula de ácido nucleico se elas exibirem complementaridade completa. Como aqui usado, moléculas que exibem "complementaridade completa" são quando cada nucleotídeo de uma das moléculas for complementar a um nucleotídeo da outra. Duas moléculas são "minimamente complementares" se elas puderem hibridar uma com a outra com estabilidade suficiente para as permitir permanecer aneladas umas às outras sob pelo menos condições convencionais de "severidade baixa". Similarmente, as moléculas são "complementares" se elas puderem hibridar umas com as outras com estabilidade suficiente para permitir que permaneçam aneladas entre si sob condições convencionais de "severidade alta". Condições de severidade convencionais são descritas por Sambrook et al., Em: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Edição, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989), e por Haymes et al., Em: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Partidas de complementaridade completa são portanto permissíveis, contanto que tais partidas não impeçam a capacidade das moléculas para formar uma estrutura dupla fita completamente. Para que uma molécula de ácido nucleico sirva como um iniciador ou sonda ela necessidade apenas estar em sequência suficientemente complementar para poder formar uma estrutura dupla fita estável sob as concentrações particulares de solvente e sal

empregadas.

[00151] Como aqui usado, uma sequência substancialmente homóloga é uma sequência de ácido nucleico que especificamente hibrida com o complemento da sequência de ácido nucleico ao qual está sendo comparada sob condições de severidade alta. As sondas de ácido nucleico e iniciadores da presente invenção podem hibridar sob condições rigorosas com uma sequência de DNA alvo. O termo "condições de hibridização rigorosas" é definido como condições sob as quais uma sonda ou iniciador especificamente hibrida com uma(s) sequência(s) alvo(s) e não com sequências não alvo(s), como pode ser determinado empiricamente. O termo "condições rigorosas" é funcionalmente definido com respeito à hibridização de uma sonda de ácido nucleico para um ácido nucleico alvo (isto é, para uma sequência de ácido nucleico particular de interesse) pelo procedimento de hibridização específico debatido em Sambrook et al., 1989, em 9.52-9.55. Vide também, Sambrook et al., 1989 em 9.47-9.52, 9.56-9.58; Kanehisa 1984 Nucl. Acids Res. 12:203-213; e Wetmur et al., 1968 J. Mol. Biol. 31:349-370. Condições de severidade apropriadas que promovem hibridização de DNA são, por exemplo, 6,0 x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) em cerca de 45°C, seguido por uma lavagem de 2,0 x SSC a 50°C, são conhecidas àqueles versados na técnica ou podem ser encontradas em Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. I., 1989, 6.3.1-6.3.6. Por exemplo, a concentração de sal na etapa de lavagem pode ser selecionada de uma severidade baixa de cerca de 2,0 x SSC a 50°C a uma severidade alta de cerca de 0,2 x SSC a 50°C. Além disso, a temperatura na etapa de lavagem pode ser aumentada de condições de severidade baixa em temperatura ambiente, cerca de 22°C, para condições de severidade alta a cerca de 65°C. Tanto a temperatura como o sal podem ser variados, ou a temperatura ou a concentração

de sal pode ser mantida constante enquanto a outra variável é alterada.

[00152] Por exemplo, hibridização usando sondas ou iniciadores de DNA ou de RNA pode ser executada a 65°C em 6x SSC, 0,5% de SDS, 5x Denhardt, 100 µg/ml de DNA não específico (por exemplo, DNA de espermatozoides de salmão sonificado) com lavagem a 0,5x SSC, 0,5% de SDS a 65°C, para severidade alta.

[00153] É contemplado que condições de hibridização de severidade mais baixa tais como hibridização e/ou temperaturas de lavagem mais baixas podem ser usadas para identificar sequências relacionadas tendo um grau inferior de similaridade de sequência se a especificidade de ligação da sonda ou iniciador à sequência(s) alvo(s) for preservada. Consequentemente, as sequências de nucleotídeo da presente invenção podem ser usadas para sua habilidade para seletivamente formar moléculas dúplices com extensões complementares de fragmentos de DNA, RNA, ou de cDNA.

[00154] Um fragmento de uma molécula de ácido nucleico pode ser qualquer fragmento dimensionado e fragmentos ilustrativos incluem fragmentos das sequências de ácido nucleico expostas em SEQ ID NO: 1 à SEQ ID NO: 79 e complementos das mesmas. Em um aspecto, um fragmento pode ser entre 15 e 25, 15 e 30, 15 e 40, 15 e 50, 15 e 100, 20 e 25, 20 e 30, 20 e 40, 20 e 50, 20 e 100, 25 e 30, 25 e 40, 25 e 50, 25 e 100, 30 e 40, 30 e 50, e 30 e 100. Em outro aspecto, o fragmento pode ser maior que 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100, ou 250 nucleotídeos.

[00155] Marcadores genéticos adicionais podem ser usados para selecionar plantas com um alelo de um QTL associados com resistência à doença fúngica de DER da presente invenção. Exemplos de bases de dados públicas de marcadores incluem, por exemplo: Maize Genome Database, Agriculture Research Service, United States

Department of Agriculture. Marcadores genéticos da presente invenção incluem marcadores "dominantes" e "codominantes". "Marcadores codominantes" revelam a presença de dois ou mais alelos (dois por indivíduo diploide). "Marcadores dominantes" revelam a presença de apenas um alelo simples. A presença do fenótipo de marcador dominante (por exemplo, uma banda de DNA) é uma indicação que o alelo está presente na condição homozigota ou heterozigota. A ausência do fenótipo de marcador dominante (por exemplo, ausência de uma banda de DNA) é meramente evidência que "algum outro" alelo indefinido está presente. No caso de populações onde os indivíduos são predominantemente homozigotos e loci são predominantemente dimórficos, marcadores dominantes e codominantes podem ser igualmente valiosos. À medida que as populações ficam mais heterozigotas e multialélicas, marcadores codominantes frequentemente são mais informativos do genótipo que os marcadores dominantes.

[00156] Em outra modalidade, marcadores, tais como marcadores repetidos de sequência simples (SSR), marcadores de AFLP, marcadores de RFLP, marcadores de RAPD, marcadores fenotípicos, marcadores de isozima, polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs), inserções ou deleções (Indels), polimorfismos de característica simples (SFPs, por exemplo, como descrito em Borevitz et al., 2003 Gen. Res. 13:513-523), perfis de transcrição de microarranjo, sequências derivadas de DNA, e sequências derivadas de RNA que estão geneticamente ligadas ou correlatadas com os alelos de uns QTL da presente invenção podem ser utilizados.

[00157] Em uma modalidade, análises com base em ácido nucleico para a presença ou ausência do polimorfismo genético podem ser usadas para a seleção de sementes em uma população de melhoramento. Uma ampla variedade de marcadores genéticos para a

análise de polimorfismos genéticos está disponível e é conhecida por aqueles versados na técnica. A análise pode ser usada para selecionar genes, QTL, alelos, ou regiões genômicas (haplótipos) que compreendem ou são ligadas a um marcador genético.

[00158] Aqui, métodos de análise de ácido nucleico são conhecidos na técnica e incluem, mas não são limitados a, métodos de detecção com base em PCR (por exemplo, ensaios de TaqMan), métodos de microarranjo, e métodos de sequenciamento de ácido nucleico. Em uma modalidade, a detecção de sítios polimórficos em uma amostra de DNA, RNA, ou cDNA pode ser facilitada pelo uso de métodos de amplificação de ácido nucleico. Tais métodos especificamente aumentam a concentração de polinucleotídeos que atravessam o sítio polimórfico, ou incluem aquele sítio e sequências localizadas distais ou proximais a este. Tais moléculas amplificadas podem ser facilmente detectadas por eletroforese em gel, métodos de detecção de fluorescência, ou outros meios.

[00159] Um método de alcançar tal amplificação emprega a reação em cadeia de polimerase (PCR) (Mullis et al., 1986 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273; Patente europeia No. 50.424; Patente europeia No. 84.796; Patente europeia No. 258.017; Patente europeia No. 237.362; Patente europeia No. 201.184; patente U. S. No. 4.683.202; patente U. S. 4.582.788; e patente U. S. 4.683.194), usando pares de iniciador que são capazes de hibridar com as sequências proximais que definem um polimorfismo em sua forma dupla fita.

[00160] Polimorfismos nas sequências de DNA podem ser detectados ou submetidos à tipagem por uma variedade de métodos bem efetivos conhecidos na técnica incluindo, mas não limitados a, aqueles descritos nas patentes U. S. 5.468.613 e 5.217.863; 5.210.015; 5.876.930; 6.030.787; 6.004.744; 6.013.431; 5.595.890;

5.762.876; 5.945.283; 5.468.613; 6.090.558; 5.800.944; e 5.616.464 todas estas são incorporados aqui por referência em suas totalidades. Porém, as composições e métodos desta invenção podem ser usados junto com qualquer método de tipagem de polimorfismo para tipar os polimorfismos em amostras de DNA genômico de milho. Estas amostras de DNA genômico de milho usadas incluem mas não são limitadas a, DNA genômico de milho isolado diretamente de uma planta de milho, DNA genômico de milho clonado, ou DNA genômico de milho amplificado.

[00161] Por exemplo, polimorfismos nas sequências de DNA podem ser detectados por hibridização com as sondas de oligonucleotídeo alelo-específicas (ASO) como descrito nas patentes U. S. 5.468.613 e 5.217.863. Patente US 5.468.613 descreve hibridações de oligonucleotídeo alelo-específicas onde variações de nucleotídeos simples ou múltiplos em sequência de ácido nucleico podem ser detectadas nos ácidos nucleicos por um processo em que a sequência contendo a variação de nucleotídeo é amplificada, tingida em uma membrana e tratada com uma sonda de oligonucleotídeo sequência-específica marcada.

[00162] Sequência de ácido nucleico alvo pode também ser detectada através de métodos de ligação de sonda como descrito na patente U. S. 5.800.944, onde a sequência de interesse é amplificada e hibrida com as sondas seguidas por ligação para detectar uma parte marcada da sonda.

[00163] Microarranjos podem também ser usados para detecção de polimorfismo, em que os conjuntos de sonda de oligonucleotídeo são montados em uma maneira sobreposta para representar uma sequência simples em um certo ponto de modo que uma diferença na sequência alvo resultaria em hibridização de sonda parcial (Borevitz et al., Genoma Res. 13:513-523 (2003); Cui et al., Bioinformatics

21:3852-3858 (2005). Em qualquer um microarranjo, espera-se haver uma pluralidade de sequências alvos que podem representar genes e/ou regiões não codificadoras em que cada sequência alvo é representada por uma série de oligonucleotídeos sobrepostos, em vez de por uma sonda simples. Esta plataforma fornece triagem de processamento alto de uma pluralidade de polimorfismos. Um polimorfismo de característica simples (SFP) é um polimorfismo detectado por uma sonda simples em um arranjo de oligonucleotídeo, em que uma característica é uma sonda no arranjo. Tipagem das sequências alvo por métodos com base em microarranjo é descrita nas patentes U. S. 6.799.122; 6.913.879; e 6.996.476.

[00164] Sequência de ácido nucleico alvo pode também ser detectada por métodos de ligação de sonda como descrito na patente U. S. 5.616.464 que emprega pelo menos um par de sondas tendo sequências homólogas às porções adjacentes da sequência de ácido nucleico alvo e tendo cadeias laterais que não covalentemente ligam para formar um tronco sob pareamento de base das sondas para a sequência de ácido nucleico alvo. Pelo menos uma das cadeias laterais tem um grupo fotoativável que pode formar uma reticulação covalente com o outro membro da cadeia lateral do tronco.

[00165] Outros métodos para detectar SNPs e Indels incluem métodos de extensão de base simples (SBE). Exemplos de métodos de SBE incluem, mas não são limitados a, aqueles descritos nas patentes U. S. 6.004.744; 6.013.431; 5.595.890; 5.762.876; e 5.945.283. Métodos de SBE são com base em extensão de um iniciador de nucleotídeo que é adjacente a um polimorfismo para incorporar um resíduo de nucleotídeo detectável sob extensão do iniciador. Em certas modalidades, o método de SBE usa três oligonucleotídeos. Dois dos oligonucleotídeos servem como iniciadores de PCR e são complementares à sequência do locus de

DNA genômico de milho que flanqueias uma região contendo o polimorfismo a ser ensaiado. Seguindo amplificação da região do genoma de milho contendo o polimorfismo, o produto de PCR é misturado com o terceiro oligonucleotídeo (chamado um iniciador de extensão) que é projetado para hibridar com o DNA amplificado adjacente ao polimorfismo na presença de DNA polimerase e dois dideoxynucleosideotrifosfatos diferencialmente marcados. Se o polimorfismo estiver presente no modelo, um dos dideoxynucleosideotrifosfatos marcados pode ser somado ao iniciador em uma extensão de cadeia de base simples. O alelo presente é depois deduzido determinando qual das duas marcações diferenciais foi acrescentada ao iniciador de extensão. Amostras homozigotas resultarão em apenas uma das duas bases marcadas que são incorporados e desse modo apenas uma das duas marcações será detectada. Amostras heterozigotas têm ambos os alelos presentes, e desse modo direcionará incorporação de ambas as marcações (em moléculas diferentes do iniciador de extensão) e desse modo ambas as marcações serão detectadas.

[00166] Em um método preferido para detectar polimorfismos, SNPs e Indels podem ser detectados por métodos descritos nas patentes U. S.: 5.210.015; 5.876.930; e 6.030.787 em que uma sonda de oligonucleotídeo tendo uma tintura fluorescente do repórter em 5' e uma tintura do extintor em 3' covalentemente ligadas às terminações 5' e 3' da sonda. Quando a sonda estiver intacta, a proximidade da tintura do repórter à tintura do extintor resulta na supressão da fluorescência da tintura do repórter, por exemplo através de transferência de energia do tipo Forster. Durante PCR, iniciadores diretos e reversos hibridam com a uma sequência específica do DNA alvo flanqueando um polimorfismo enquanto a sonda de hibridização hibrida com a sequência contendo polimorfismo dentro do produto de

PCR amplificado. No ciclo de PCR subsequente, a DNA polimerase com atividade de exonuclease de 5' → 3' cliva a sonda e separa a tintura do repórter da tintura do extintor que resulta em fluorescência aumentada do repórter.

[00167] Para o propósito de mapeamento de QTL, os marcadores incluídos deveriam ser diagnósticos da origem para que conclusões sejam feitas acerca das populações subsequentes. Marcadores de SNP são ideais para mapear porque a probabilidade que um alelo de SNP particular é derivado de origens independentes nas populações de extensão de uma espécie particular é muito baixa. Como tal, marcadores de SNP são úteis para rastrear e ajudar na introgressão de QTLs, particularmente no caso de haplótipos.

[00168] A ligação genética das moléculas de marcadores adicionais pode ser estabelecida por um modelo de mapeamento dos genes tal como, sem limitação, o modelo de marcador de flaqueamento relatado por Lander et al., (Lander et al., 1989 Genetics, 121:185-199), e o mapeamento de intervalo, com base nos métodos de probabilidade máxima descritos na mesma, e implementado no pacote de software MAPMAKER/QTL (Lincoln e Lander, *Mapping Genes Controlling Quantitative Traits Using MAPMAKER/QTL*, Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts (1990). Software adicional inclui Qgene, Versão 2.23 (1996), Department of Plant Breeding and Biometry, 266 Emerson Hall, Cornell University, Ithaca, NI). Uso de software de Qgene é uma abordagem particularmente preferida.

[00169] Uma estimativa de probabilidade máxima (MLE) para a presença de um marcador é calculada, junto com uma MLE não assumindo nenhum efeito de QTL, para evitar falsos positivos. Um $\log_{10}$ de uma razão de vantagens (LOD) é depois calculado como: $LOD = \log_{10} (MLE \text{ para a presença de uns QTL} / MLE \text{ dado nenhum QTL ligado})$. A contagem de LOD essencialmente indica quanto mais

provavelmente os dados terão surgidos, assumindo a presença de uns QTL versus sua ausência. O valor limiar de LOD para evitar um falso positivo com uma confiança dada, diga-se 95%, depende do número de marcadores e do comprimento do genoma. Gráficos indicando limiares de LOD são expostos em Lander et al., (1989), e também descritos por Arús e Moreno-González, *Plant Breeding*, Hayward, Bosemark, Romagosa (eds.) Chapman & Hall, Londres, pp. 314-331 (1993).

[00170] Modelos adicionais podem ser usados. Muitas modificações e abordagens alternativas ao mapeamento de intervalo foram relatadas, incluindo o uso de métodos não paramétricos (Kruglyak et al., 1995 *Genetics*, 139:1421-1428). Métodos de regressão múltiplos ou modelos podem também ser usados em que o traço é regressado em um número grande de marcadores (Jansen, *Biometrics in Plant Breed*, van Oijen, Jansen (eds.) *Proceeding of the Ninth Meeting of the Eucarpia Section Biometrics in Plant Breeding*, Países Baixos, pp. 116-124 (1994); Weber e Wricke, *Advances in Plant Breeding*, Blackwell, Berlim, 16 (1994)). Procedimentos que combinam mapeamento de intervalo com análise de regressão, por meio do qual o fenótipo é regressado sobre uns QTL putativos simples em um intervalo de marcador dado, e ao mesmo tempo sobre vários marcadores que servem como "cofatores", foi relatado através de Jansen et al., (Jansen et al. 1994 *Genetics*, 136:1447-1455) e Zeng (Zeng 1994 *Genetics* 136:1457-1468). Em geral, o uso de cofatores reduz o erro de propensão e de amostragem das posições de QTL estimadas (Utz e Melchinger, *Biometrics in Plant Breeding*, van Oijen, Jansen (eds.) *Proceedings of the Ninth Meeting of the Eucarpia Section Biometrics in Plant Breeding*, Países Baixos, pp. 195-204 (1994), assim melhorando a precisão e eficiência do mapeamento de QTL (Zeng 1994). Estes modelos podem ser estendidos para experimentos de multiambientes

para analisar interações de genótipo-ambiente (Jansen et al., 1995 *Theor. Appl. Genet.* 91:33-3).

[00171] Seleção das populações de mapeamento apropriadas é importante para mapear construção. A escolha de uma população de mapeamento apropriada depende do tipo de sistemas de marcador empregado (Tanksley et al., *Molecular mapping in plant chromosomes. chromosome structure and function: Impact of new concepts* J. P. Gustafson e R. Appels (eds.). Plenum Press, Nova Iorque, pp. 157-173 (1988)). Consideração deve ser dada à fonte dos pais (adaptado vs. exótico) usada na população de mapeamento. As taxas de pareamento e recombinação de cromossomos podem ser perturbadas severamente (suprimidas) em amplos cruzamentos (adaptados x exóticos) e em geral rendem distâncias de ligação grandemente reduzidas. Amplos cruzamentos usualmente fornecerão populações segregantes com um arranjo relativamente grande de polimorfismos quando comparado à progênie em um cruzamento estreito (adaptado x adaptado).

[00172] Uma população F_2 é a primeira geração de autocruzamento. Usualmente uma planta F_1 simples é autocruzada para gerar uma população segregante para todos os genes de maneira Mendeliana (1:2:1). Informação genética máxima é obtida de uma população F_2 completamente classificada usando um sistema de marcador codominante (Mather, *Measurement of Linkage in Heredity*: Methuen e Co., (1938)). No caso de marcadores dominantes, testes de progênie (por exemplo F_3 , BCF_2) são requeridos para identificar os heterozigotos, desse modo tornando-os equivalentes a uma população F_2 completamente classificada. Porém, este procedimento é frequentemente proibitivo por causa do custo e tempo envolvidos na testagem da progênie. Teste da progênie de indivíduos F_2 é frequentemente usado na construção do mapa onde os fenótipos não

refletem o genótipo consistentemente (por exemplo resistência à doença) ou onde a expressão do traço é controlada por uns QTL. Dados de segregação das populações de teste da progênie (por exemplo F_3 ou BCF_2) podem ser usados na construção do mapa. Seleção assistida com marcador pode ser depois aplicada à progênie de cruzamento com base nas associações de mapa de marcador-traço (F_2 , F_3), onde os grupos de ligação não foram completamente desassociados pelos eventos de recombinação (isto é, desequilíbrio máximo).

[00173] Linhagens endogâmicas recombinantes (RIL) (linhagens geneticamente relacionadas; usualmente $> F_5$, desenvolvidas continuamente autocruzando linhagens F_2 em direção à homozigosidade) podem ser usadas como uma população de mapeamento. Informação obtida de marcadores dominantes pode ser maximizada usando RIL porque todos os loci são homozigotos ou quase isso. Sob condições de ligação apertada (isto é, cerca de $< 10\%$ recombinação), marcadores dominantes e codominantes avaliados nas populações de RIL fornecem mais informação por indivíduo de qualquer tipo de marcador em populações de retrocruzamento (Reiter et al., 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA)* 89:1477-1481). Porém, à medida que a distância entre os marcadores fica maior (isto é, loci ficam mais independentes), a informação em populações de RIL diminui dramaticamente.

[00174] Populações de retrocruzamento (por exemplo, geradas de um cruzamento entre uma variedade com sucesso (o pai recorrente) e outra variedade (o pai doador) não carregando um traço presente no anterior) podem ser utilizadas como uma população de mapeamento. Uma série de retrocruzamentos para o pai recorrente pode ser feita para restabelecer a maioria de seus traços desejáveis. Desse modo uma população é criada que consiste em indivíduos quase como o pai

recorrente, mas cada indivíduo carrega quantidades variadas ou mosaico de regiões genômicas do pai doador. Populações de retrocruzamento podem ser úteis para mapear marcadores dominantes se todos os loci no pai recorrente forem homozigotos e o doador e o pai recorrente tiverem alelos marcadores polimórficos contrastantes (Reiter et al., 1992). Informações obtidas de populações de retrocruzamento usando marcadores codominantes ou dominantes são menores que as obtidas de populações F_2 porque um, em vez de dois, gametas recombinantes são amostrados por planta. Porém, populações de retrocruzamento são mais informativas (em saturação de marcador baixa) quando comparadas às RILs à medida que a distância entre os loci ligados em populações de RIL aumenta (isto é, cerca de 0,15% de recombinação). Recombinação aumentada pode ser benéfica para resolução de ligações apertadas, mas pode ser indesejável na construção de mapas com saturação de marcador baixa.

[00175] Linhagens quase-isogênicas (NIL) criadas por muitos retrocruzamentos para produzir um arranjo de indivíduos que são quase idênticos em composição genética com exceção do traço ou região genômica sob interrogação podem ser usadas como uma população de mapeamento. No mapeando com NIL, apenas é esperado que uma porção dos loci polimórficos mapeie uma região selecionada.

[00176] Análise de segregante de massa (BSA) é um método desenvolvido para a identificação rápida de ligação entre marcadores e traços de interesse (Michelmore et al. 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA)* 88:9828-9832). Em BSA, duas amostras de DNA aumentadas são tiradas de uma população segregante que origina de um cruzamento simples. Estas massas contêm indivíduos que são idênticos para um traço particular (resistentes ou suscetíveis à doença

particular) ou região genômica, mas arbitrários em regiões não ligadas (isto é, heterozigotos). Regiões não ligadas para a região alvo não diferirão entre as amostras aumentadas de muitos indivíduos em BSA.

[00177] Plantas da presente invenção podem ser parte ou geradas de um programa de melhoramento. A escolha do método de melhoramento depende do modo de reprodução da planta, da hereditariedade do(s) traço(s) sendo melhorado(s), e do tipo de cultivar usado comercialmente (por exemplo, cultivar de híbrido de F1, cultivar de purelina, etc). Um cultivar é uma raça ou variedade de uma espécie de planta que foi criada ou selecionada intencionalmente e mantida através de cultivo.

[00178] Abordagens não limitativas selecionadas para melhorar as plantas da presente invenção são expostas abaixo. Um programa de melhoramento pode ser intensificado usando seleção assistida com marcador (MAS) na progênie de qualquer cruzamento. É entendido que marcadores de ácido nucleico da presente invenção podem ser usados em um programa (melhoramento) de MAS. É também entendido que quaisquer cultivares comerciais e não comerciais podem ser utilizados em um programa de melhoramento. Fatores tais como, por exemplo, vigor de aparecimento, vigor vegetativo, tolerância ao estresse, resistência à doença, ramificação, florescência, rebento da semente, tamanho da semente, densidade da semente, sustentabilidade, e facilidade de debulha etc. em geral ditarão a escolha.

[00179] Para traços altamente hereditários, uma escolha de plantas individuais superiores avaliadas em uma localização simples será efetiva, enquanto que para traços com hereditariedade baixa, a seleção deveria ser com base em valores médios obtidos de avaliações replicadas de famílias de plantas relacionadas. Métodos de seleção populares incluem seleção de genealogia, seleção de

genealogia modificada, seleção de massa, e seleção recorrente comumente. Em um aspecto preferido, um retrocruzamento ou programa de melhoramento recorrente é empreendido.

[00180] A complexidade da herança influencia a escolha do método de melhoramento. Melhoramento por retrocruzamento pode ser usado para transferir um ou alguns genes favoráveis para um traço altamente hereditário em um cultivar desejável. Esta abordagem foi extensivamente usada para criar cultivares resistentes à doença. Várias técnicas de seleção recorrentes são usadas para melhorar os traços quantitativamente herdados controlados por numerosos genes.

[00181] Linhagens de melhoramento podem ser testadas e comparadas aos padrões apropriados em ambientes representativos da(s) área(s) alvo(s) comercial(is) para duas ou mais gerações. As melhores linhagens são as candidatas para cultivares comerciais novos; aquelas ainda deficientes em traços podem ser usadas como pais para produzir populações novas para outra seleção.

[00182] O desenvolvimento de híbridos de milho de elite novos requer linhagens endogâmicas para o desenvolvimento e seleção de elite, o cruzamento destas linhagens e a seleção dos cruzamentos de híbridos superiores. A semente híbrida pode ser produzida através de cruzamentos manuais entre pais férteis selecionados ou usando sistemas de esterilidade masculina. Dados adicionais sobre as linhagens parentais, como também o fenótipo do híbrido, influenciam a decisão do responsável pelo melhoramento se continua com o cruzamento híbrido específico.

[00183] Melhoramento de genealogia e métodos de melhoramento de seleção recorrentes podem ser usados para desenvolver cultivares de populações de melhoramento. Programas de melhoramento combinam traços desejáveis de dois ou mais cultivares ou várias fontes baseadas amplas em fundos gerais de melhoramento dos quais

os cultivares são desenvolvidos por autocruzamento e seleção dos fenótipos desejados. Cultivares novos podem ser avaliados para determinar que tem potencial comercial.

[00184] Melhoramento por retrocruzamento foi usado para transferir genes para um traço simplesmente herdado, altamente hereditário em um cultivar homozigoto desejável ou linhagem endogâmica, que é o pai recorrente. A fonte do traço a ser transferido é chamada o pai doador. Após o cruzamento inicial, indivíduos que possuem o fenótipo do pai doador são selecionados e repetidamente cruzados (retrocruzados) para o pai recorrente. É esperado que a planta resultante tenha a maioria dos atributos do pai recorrente (por exemplo, cultivar) e, além disso, o traço desejável transferido do pai doador.

[00185] O procedimento de descendência de semente simples no sentido restrito refere-se à plantação de uma população segregante, coleta de uma amostra de uma semente por planta, e uso da amostra de uma semente para plantar a próxima geração. Quando a população tiver sido avançada do F_2 para o nível desejado de melhoramento, as plantas das quais as linhagens são derivadas cada uma irá trilhar para indivíduos F_2 diferentes. O número de plantas em uma população cai cada geração devido à insuficiência de algumas sementes de germinarem ou algumas plantas de produzirem pelo menos uma semente. Como resultado, nem todas as plantas F_2 originalmente amostradas na população serão representados por uma progênie quando o avanço de geração for concluído.

[00186] Descrições de outros métodos de melhoramento que são comumente usadas para traços diferentes e plantações podem ser encontradas em um de vários livros de referência (Allard, "Principles of Plant Breeding", John Wiley & Sons, NI, U. de CA, Davis, CA, 50-98, 1960; Simmonds, "Principles of Crop Improvement", Longman, Inc., NI,

369-399, 1979; Sneep e Hendriksen, "Plant Breeding Perspectives", Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1979; Fehr, *In: Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 2ª Edição, *Monograph.*, 16:249, 1987; Fehr, "Principles of Variety Development", *Theory and Technique*, (Vol. 1) e *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NI, 360-376, 1987).

[00187] Uma alternativa para mapeamento de QTL tradicional envolve alcançar resolução mais alta mapeando haplótipos, versus marcadores individuais (Fan et al., 2006 *Genetics* 172:663-686). Esta abordagem trilha blocos de DNA conhecidos como haplótipos, como definidos por marcadores polimórficos, que são assumidos ser idênticos pela descendência na população de mapeamento. Esta suposição resulta em um tamanho de amostra efetivo maior, oferecendo maior resolução de QTL. Métodos para determinar a significação estatística de uma correlação entre um fenótipo e um genótipo, neste caso um haplótipo, pode ser determinado por qualquer teste estatístico conhecido na técnica e com qualquer limiar aceito de significação estatística sendo requerido. A aplicação de métodos e limiares de significação particulares está bem dentro da habilidade do médico usual da técnica.

[00188] É também entendido, que a presente invenção fornece células bacterianas, virais, microbianas, de insetos, mamíferas e vegetais compreendendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção.

[00189] Como aqui usado, uma "molécula de ácido nucleico", quer ser uma molécula de ocorrência natural ou do contrário, pode ser "substancialmente purificada", se desejado, referindo a uma molécula separada de substancialmente todas as outras moléculas normalmente associadas a ela em seu estado nativo. Mais

preferivelmente uma molécula substancialmente purificada é a espécie predominante presente em uma preparação. Uma molécula substancialmente purificada pode ser mais que 60% livre, preferivelmente 75% livre, mais preferivelmente 90% livre, e o mais preferivelmente 95% livre das outras moléculas (exclusivo de solvente) presentes na mistura natural. O termo "substancialmente purificado" não é intencionado abranger moléculas presentes em seu estado nativo.

[00190] Os agentes da presente invenção preferivelmente serão "biologicamente ativos" com respeito a um atributo estrutural, tal como a capacidade de um ácido nucleico para hibridar com a outra molécula de ácido nucleico, ou a habilidade de uma proteína para ser ligada por um anticorpo (ou competir com outra molécula para tal ligação). Alternativamente, um tal atributo pode ser catalítico, e desse modo envolver a capacidade do agente para mediar uma reação ou resposta química.

[00191] Os agentes da presente invenção podem ser também recombinantes. Como aqui usado, o termo recombinante significa qualquer agente (por exemplo DNA, peptídeo etc.), ou seja, ou resultados, porém indiretos, de manipulação humana de uma molécula de ácido nucleico.

[00192] Os agentes da presente invenção podem ser marcados com reagentes que facilitam a detecção do agente (por exemplo marcações fluorescentes (Prober et al., 1987 Science 238:336-340; Albarella et al., Patente europeia 144914), marcações químicas (Sheldon et al., Patente U. S. 4.582.789; Albarella et al., Patente U. S. 4.563.417), bases modificadas (Miyoshi et al., Patente europeia 119448).

[00193] Tendo agora em geral descrito a invenção, a mesma será mais facilmente entendida em referência aos exemplos a seguir que

são fornecidos por via de ilustração, e não são destinados a serem limitativos da presente invenção, a menos que especificado.

EXEMPLOS

[00194] Tendo ilustrado e descrito os princípios da presente invenção, deveria ser evidente às pessoas versadas na técnica que a invenção pode ser modificada em arranjo e detalhada sem abandono de tais princípios. Nós reivindicamos todas as modificações que estejam dentro do espírito e escopo das reivindicações em anexo.

[00195] Todas as publicações e documentos de patente publicados citados neste relatório descritivo são incorporados aqui por referência na mesma extensão como se cada publicação ou pedido de patente individual fossem específica e individualmente indicados para serem incorporados por referência.

EXEMPLO 1: INOCULAÇÃO E FENOTIPAGEM PARA PODRIDÃO DA ESPIGA POR DIPLODIA (DER)

[00196] Reação da planta de milho à inoculação de DER em várias geografias foi avaliada e marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER foram descobertos pelos meios a seguir. Para avaliar a reação à DER, as plantas são artificialmente inoculadas com uma mistura contendo isolado de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* ou os isolados de qualquer patógeno. Plantas são inoculadas pelos métodos de deposição de uma suspensão de esporos no pedúnculo, colocando o inóculo no verticilo apical das plantas de acordo com Flett e McLaren (1994) e Bensch (1995) ou inoculado de acordo com Chambers (1988), Klapproth e Hawk (1991), e Villena (1969).

[00197] Resistência e suscetibilidade à DER podem ser determinadas por exame de espigas ou grão descascado.

[00198] Porcentagem de espigas podres é calculada após as espigas serem colhidas a uma umidade média de 18% a 21%. As

espigas são visualmente examinadas para sintomas de DER. As espigas infetadas são expressadas como uma porcentagem do número total de espigas colhidas em cada diagrama.

[00199] Porcentagem de grão podre é calculada após colher à mão e debulhar as espigas. Peso de grão total e peso de grão podre são determinados e a porcentagem de grão podre é usada como dados fenotípicos. Aqui, até 8% grão podre é considerado resistente, 8 - 20% grão podre é considerado meio resistente ou tolerante, e maior que 20% grão podre é considerado suscetível.

EXEMPLO 2: POPULAÇÃO DE MAPEAMENTO 2 (CV183/CV174 +01HG14) PARA DER USANDO *Stenocarpella maydis*

[00200] DER é um patógeno de podridão da espiga difundido de milho que está presente em muitos países. Para identificar marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER, reação de plantas de milho inoculadas foi avaliada na Argentina, EUA, e África do Sul. Na presente invenção marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER foram identificados pelos meios a seguir. Uma população de mapeamento foi desenvolvida por identificar regiões genômicas de milho associadas à DER. Uma população de mapeamento de 146 indivíduos das famílias de $F_{2:3}$ foi desenvolvida da população de CV183/CV174. Experimentações foram conduzidas ao longo de três geografias. As experimentações foram avaliadas em três localizações na Argentina (1 replicação por localização), duas localizações nos EUA (2 replicações por localização), e em quatro localizações na África do Sul (2 replicações por localização). As plantas foram artificialmente inoculadas com *Stenocarpella maydis*, e os dados de incidência de DER foram colhidos. A incidência de DER fenotípica foi calculada como porcentagem das espigas infetadas dentro de um diagrama. O DNA genômico foi isolado das famílias de $F_{2:3}$ e triados com 123 marcadores de SNP. Após análise de controle

de qualidade, 115 marcadores foram escolhidos para o estudo de mapeamento.

[00201] Mapeamento de QTL foi executado com Windows QTL Cartographer Versão 2.5 usando Mapeamento de Intervalo Composto (CIM) com um método de regressão direta. Mapeamento de Intervalo Múltiplo (MIM) foi usado para também refinar o mapeamento de QTL usando um método de seleção de regressão direta nos marcadores. Critérios para a seleção modelo foram fixados em uma probabilidade de R^2 parcial a um nível de significação de 0,01. MIM foi executado para cada geografia, combinação em pares, combinações das geografias, e combinado ao longo de todas as geografias estimando os efeitos de QTL, ao mesmo tempo otimizando as posições de QTL, e procurando QTLs novos por meio de QTLs Principais e interações de QTL.

[00202] figura 1 provê os QTL flanqueando marcadores de SNP observados estarem associados com DER. Os marcadores de QTL e SNP fornecidos na presente invenção podem ser usados para a introgressão da resistência à DER dentro das plantas de milho.

EXEMPLO 3: POPULAÇÃO DE MAPEAMENTO 3 (CV128/CV162)
PARA DER USANDO UMA MISTURA DE *Stenocarpella macrospora* E *Stenocarpella maydis*

[00203] DER é um patógeno de podridão da espiga difundido de milho que está presente em muitos países. Para identificar marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER, reação de plantas de milho inoculadas foi avaliada no Brasil central. Dos dois patógenos de DER no Brasil, *S. macrospora* é mais proeminente na região central e *S. maydis* é mais proeminente no sul. Na presente invenção, marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER foram identificados pelos meios a seguir. Uma população de mapeamento foi desenvolvida para identificar regiões genômicas de milho associadas

com resistência à DER. Na população de mapeamento, 769 progênies de F₂ foram desenvolvidas do cruzamento de CV128/CV162. A experimentação no campo foi conduzida no Brasil central em um projeto de bloco randomizado completo com três replicações. As plantas foram inoculadas artificialmente duas vezes com uma mistura de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis* por deposição de esporos fúngicos na inserção da espiga com o talo. Foi calculada incidência de DER fenotípica como porcentagem de grão podre de grão total. DNA genômico foi triado com 117 marcadores de SNP. Análise de marcador simples foi executada através de regressão linear simples. Um modelo de regressão múltipla com todos os marcadores significativos foi executado, e o modelo foi também refinado com um procedimento em etapas com um nível de significação de 0,15 para uma entrada de marcador e nível de significação de 0,10 permanece no modelo. figura 2 fornece marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER deste estudo de mapeamento.

EXEMPLO 4: POPULAÇÃO DE MAPEAMENTO (CV128*2/CV162) PARA DER USANDO *Stenocarpella macrospora* E *Stenocarpella maydis*

[00204] DER é um patógeno de podridão da espiga difundido de milho que é apresentado em muitos países. Para identificar marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER, reação de plantas de milho inoculadas foi avaliada no Brasil central. Na presente invenção, marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER foram validados pelos meios a seguir. Uma população de 260 indivíduos de BC1F3 foi desenvolvida do cruzamento de CV128*2/CV162. O estudo foi conduzido no Brasil central em um projeto de bloco randomizado completo com quatro replicações. Duas replicações foram artificialmente inoculadas com *Stenocarpella maydis*, e duas foram inoculados artificialmente com

Stenocarpella macrospora. Três inoculações foram feitas por deposição de esporos fúngicos na inserção da espiga com o talo. Foi calculada incidência de DER fenotípica como porcentagem de grão podre de grão total. DNA genômico foi triado com um total de 170 marcadores de SNP. Marcadores de QTL e SNP observados estarem associados com resistência à DER de *Stenocarpella macrospora* são fornecidos na figura 3. Marcadores de QTL e SNP observados estarem associados com resistência à DER de *Stenocarpella maydis* são fornecidos na figura 4. QTL associados com resistência à DER de *S. macrospora* foram identificados nos Cromossomos 4 e 7. No Cromossomo 4, uns QTL foram identificados que estavam associados com resistência a DER de *S. maydis*.

EXEMPLO 5: POPULAÇÃO DE MAPEAMENTO (CV162/CV129 + CV128) USANDO *Stenocarpella maydis* E *Stenocarpella macrospora* NO BRASIL CENTRAL

[00205] DER é um patógeno de podridão da espiga difundido de milho que está presente em muitos países. Para identificar marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER, reação de plantas de milho inoculadas foi avaliada no Brasil central. Na presente invenção, os marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER foram identificados pelos meios a seguir. Uma população de mapeamento foi desenvolvida para identificar regiões genômicas de milho associadas com resistência à DER. Na população de mapeamento, 140 progênies de haploides dobrados (DH) foram desenvolvidas do cruzamento de duas linhagens endogâmicas, CV162 e CV129.

[00206] Cada progênie de DH foi cruzada em teste com o testador CV128 suscetível e os híbridos resultantes foram avaliados em três localizações diferentes dentro da região Central do Brasil com duas replicações por sítio, durante a estação do verão de 2005-2006. Após

o tempo de fluorescência, todas as espigas foram inoculadas artificialmente com uma mistura de *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora* e *Fusarium moniliforme*. Esta mistura foi extensamente usada pelo programa de melhoramento no Brasil para triar um complexo de doença conhecida como Grãos Ardidos. Colheita das experimentações de rendimento foi executada à mão e calculada a incidência de DER fenotípica como porcentagem de espigas podres.

[00207] O DNA genômico foi isolado de toda progênie de DH e triado com 106 marcadores de SNP. Mapeamento de QTL foi executado com QTL cartógrafo Versão 2.5 de North Caroline State University, usando mapeamento de intervalo composto (CIM) com um método de regressão direta e tipo de cruzamento ajustado para RiO (linhagem endogâmica recombinante, derivada através de linhagens haploides dobradas). Dados para este Exemplo são mostrados na figura 5.

[00208] Regiões nos cromossomos três e cinco exibiram consistência ao longo das localizações e anos quando comparados com os resultados dados no Exemplo 6.

EXEMPLO 6: POPULAÇÃO DE MAPEAMENTO DE DER (CV162/CV129 + CV128) USANDO *Stenocarpella maydis* E *Stenocarpella macrospora* NO CENTRO E SUL DO BRASIL

[00209] DER é um patógeno de podridão da espiga difundido de milho que está presente em muitos países. Para identificar marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER, reação das plantas de milho inoculadas foi avaliada no centro e sul do Brasil. Na presente invenção, marcadores de QTL e SNP associados com resistência à DER foram identificados pelos meios a seguir. Uma população de mapeamento foi desenvolvida para identificar regiões genômicas de milho associadas com resistência à DER. Na população de mapeamento, 144 progênies haploides dobradas (DH) foram

desenvolvidas do cruzamento de duas linhagens endogâmicas, CV162 e CV129. Plantas foram crescidas no sul e centro do Brasil em três localizações diferentes em cada geografia durante 2006-2007. As plantas foram artificialmente inoculadas com uma mistura de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* depositando uma suspensão de esporos na planta. DNA genômico foi triado com 107 marcadores de SNP. Porcentagem das espigas podres foi usada como dados fenotípicos na análise do mapeamento. figura 6 fornece marcadores de QTL e de flaqueamento de SNP associados com resistência à DER. Os marcadores de QTL e SNP fornecidos podem ser usados para a introgressão da resistência à DER em plantas de milho.

EXEMPLO 7: ENSAIOS DE MARCADORES EXEMPLARES PARA DETECTAR RESISTÊNCIA À DER

[00210] Em uma modalidade, a detecção de sítios polimórficos em uma amostra de DNA, RNA, ou cDNA pode ser facilitada através do uso de métodos de amplificação de ácido nucleico. Tais métodos especificamente aumentam a concentração de polinucleotídeos que atravessam o sítio polimórfico, ou incluem aquele sítio e sequências localizadas distais ou proximais ao mesmo. Tais moléculas amplificadas podem ser detectadas facilmente por eletroforese em gel, métodos de detecção de fluorescência, ou outros meios. Iniciadores e sondas exemplares para amplificar e detectar regiões genômicas associadas com resistência à DER são dados na Tabela 1.

TABELA 1: Ensaios exemplares para detectar resistência à DER.

Marcador	SEQ ID Marcador	Posição do SNP	SEQ ID Iniciador Direto	SEQ ID Iniciador Reverso	SEQ ID Sonda 1	SEQ ID Sonda 2
NC0003210	27	129	48	49	56	57

NC0106527	28	356	50	51	58	59
NC0015344	5	420	52	53	60	61
NC0016137	6	482	54	55	62	63

EXEMPLO 8: SONDAS DE HIBRIDIZAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEO ÚTEIS PARA DETECTAR PLANTAS DE MILHO COM LOCI DE RESISTÊNCIA À DER

[00211] Oligonucleotídeos podem também ser usados para detectar ou submeter à tipagem os polimorfismos associados com resistência à DER descritos aqui por métodos de detecção de SNP com base em hibridização. Oligonucleotídeos capazes de hibridar com as sequências de ácido nucleico isolados que incluem o polimorfismo são fornecidos. Está dentro da habilidade da técnica projetar ensaios com severidade experimentalmente determinada para discriminar entre os estados alélicos dos polimorfismos apresentados aqui. Ensaios exemplares incluem Southern blots, Northern blots, microarranjo, hibridização *in situ*, e outros métodos de detecção de polimorfismo com base em hibridização. Oligonucleotídeos exemplares para uso em detecção de SNP com base em hibridização são fornecidos na Tabela 2. Estes oligonucleotídeos podem ser detectavelmente marcados com marcações radioativas, fluoróforos, ou outros meios quimioluminescentes para facilitar a detecção da hibridização para amostras de ácidos nucleicos genômicos ou amplificados derivados de uma ou mais plantas de milho usando métodos conhecidos na técnica.

TABELA 2: SONDAS DE HIBRIDIZAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEO

Marcador	Marcador SEQ ID	Posição do SNP	Sonda de hibridização	SEQ ID Sonda
NC0003210	27	129	TTTTTGTCTCAAAGTA	64
NC0003210	27	129	TTTTTGTGTCAAAGTA	65
NC0106527	28	356	ACCATACGGACCCACT	66

NC0106527	28	356	ACCATAC <u>C</u> GACCCACT	67
NC0015344	5	420	GGAGGCAG <u>T</u> TTCTTTTG	68
NC0015344	5	420	GGAGGCA <u>A</u> TTCTTTTG	69
NC0016137	6	482	TGGGTGCT <u>I</u> ACTGCTTC	70
NC0016137	6	482	TGGGTGCC <u>C</u> ACTGCTTC	71

*SNPs EM NEGRITO E SUBLINHADO

EXEMPLO 9: SONDAS DE OLIGONUCLEOTÍDEO ÚTEIS PARA DETECTAR PLANTAS DE MILHO COM LOCI DE RESISTÊNCIA À DER ATRAVÉS DE MÉTODOS DE EXTENSÃO DE BASE SIMPLES

[00212] Oligonucleotídeos podem ser também usados para detectar ou submeter à tipagem os polimorfismos associados com resistência à DER descritos aqui por métodos de detecção de SNP com base em (SBE) de extensão de base simples. Oligonucleotídeos exemplares para uso em detecção de SNP com base em SBE são fornecidos na Tabela 9. Métodos de SBE são com base em extensão de um iniciador de nucleotídeo que é hibridado com as sequências adjacentes a um polimorfismo para incorporar um resíduo de nucleotídeo detectável na extensão do iniciador. É também antecipado que o método de SBE pode usar três oligonucleotídeos. Dois dos oligonucleotídeos servem como iniciadores de PCR e são complementares à sequência do locus que flanqueia uma região contendo o polimorfismo para ser ensaiado. Iniciadores de PCR exemplares que podem ser usados para submeter à tipagem os polimorfismos descritos nesta invenção são fornecidos na Tabela 3 nas colunas marcadas "SEQ ID Iniciador Direto" e "SEQ ID Iniciador Reverso". Seguindo amplificação da região contendo o polimorfismo, o produto de PCR é hibridado com um iniciador de extensão que anela ao DNA amplificado adjacente ao polimorfismo. DNA polimerase e dois dideoxinucleosídeo trifosfatos diferencialmente marcados são depois fornecidos. Se o polimorfismo estiver presente no modelo, um dos dideoxinucleosídeo trifosfatos marcados pode ser

adicionado ao iniciador em uma extensão de cadeia de base simples. O alelo presente é depois deduzido determinando qual das duas marcações diferenciais foi acrescentada ao iniciador de extensão. Amostras homozigotas resultarão em apenas uma das duas bases marcadas que estão incorporadas e desse modo apenas uma das duas marcações será detectado. Amostras heterozigotas têm ambos os alelos presentes, e desse modo incorporação direta de ambas as marcações (em moléculas diferentes do iniciador de extensão) e desse modo ambas as marcações serão detectadas.

TABELA 3: SONDAS (INICIADORES DE EXTENSÃO) PARA ENSAIOS DE EXTENSÃO DE BASE SIMPLES (SBE).

Marcador	SEQ ID marcad or	Posiç ão do SNP	Sonda (SBE)	SEQ ID Sonda
NC0003210	27	129	TAAAACCTTTTTTTGTC	72
NC0003210	27	129	CTGAGGCAATACTTTGA	73
NC0106527	28	356	TGGCAACAAACCATACG	74
NC0106527	28	356	TGAAGAATAAGTGGGTC	75
NC0015344	5	420	AAAATGTTGGGAGGCAG	76
NC0015344	5	420	AATGGGCAGCAAAAGAA	77
NC0016137	6	482	CCAGCTGCGTGGGTGCT	78
NC0016137	6	482	TCTCTATCAGAAGCAGT	79

EXEMPLO 10: INTROGRESSÃO DE RESISTÊNCIA À DER EM UMA PLANTA DE MILHO

[00213] Melhoradores de milho podem usar os marcadores de SNP fornecidos na presente invenção para a introgressão da resistência à DER em uma planta de milho. Os marcadores fornecidos na Tabela 4 podem ser usados para monitorar a introgressão de QTL de resistência à DER em uma planta de milho. Além disso, Tabela 10 inclui fontes exemplares de resistência à DER.

[00214] A introgressão de um ou mais loci de resistência é alcançada por meio de um ou mais ciclos de retrocruzamento para um pai recorrente com um ou mais características agronômicas preferidas, acompanhado por seleção para reter o um ou mais loci de resistência à DER do pai doador usando os marcadores da presente invenção. Introgressão pode ser monitorada através de genotipagem de uma ou mais plantas e determinando o estado alélico do um ou mais loci de resistência à DER. Este procedimento de retrocruzamento é implementado em qualquer estágio em desenvolvimento de variedade e ocorre junto com melhoramento para um ou mais traços de interesse incluindo traços transgênicos e não transgênicos.

[00215] Alternativamente, uma abordagem de melhoramento direta é empregada em que um ou mais loci de resistência à DER podem ser monitorados para introgressão com sucesso seguindo um cruzamento com um pai suscetível com gerações subsequentes genotipadas para um ou mais loci de resistência à DER e para um ou mais traços adicionais de interesse, incluindo traços transgênicos e não transgênicos.

TABELA 4: SUMÁRIO DE MARCADORES DE SNP ASSOCIADOS COM RESISTÊNCIA À DER E FONTES EXEMPLARES DE RESISTÊNCIA À DER PARA CADA ALELO.

Marcador	Crom	Pos	Local resistente à DER	Marcador de SEQ ID	Alelo resistente	Alelo suscetível	Fonte resistente	Posição do SNP
NC0009449	1	82,0	1	1	AA	GG	CV174	188
NC0025863	1	96,7	1	2	AA	GG	CV174	129
NC0199970	1	191,6	2	3	TT	CC	CV129	386
NC0039486	1	207,9	2	4	AA	CC	CV129	206
NC0015344	1	221,1	3	5	GG	AA	CV162	420
NC0016137	1	256,3	3	6	CC	TT	CV162	482
NC0106389	3	14,2	4	7	GG	AA	CV162	222
NC0199309	3	83,2	5	8	AA	GG	CV162	303
NC0009470	3	88,0	4	9	GG	CC	CV162	137
NC0199941	3	99,2	5	10	AA	GG	CV162	101
NC0030587	3	179,7	6	11	AA	CC	CV183	84
NC0019414	3	204,2	6	12	AA	CC	CV183	275
NC0009057	4	21,7	7	13	TT	GG	CV162	229

NC0199875	4	46,8	7	14	TT	GG	CV162	125
NC0201962	4	71,0	8	15	TT	GG	CV162	244
NC0105550	4	94,8	8	16	*****	CCTACCTTCAGAA	CV162	241-253
NC0032557	4	95,1	9	17	CC	GG	CV174	413
NC0105197	4	99,9	10	18	CC	TT	CV129	321
NC0009620	4	109,2	9	19	TT	GG	CV174	175
NC0200096	4	120,8	10	20	GG	TT	CV129	165
NC0009668	5	65,2	11	21	GG	AA	CV129	1
NC0111346	5	79,0	12	22	AA	CC	CV162	366
NC0200395	5	81,3	11	23	GG	CC	CV129	163
NC0040366	5	84,1	12	24	AA	CC	CV162	119
NC0202210	5	107,8	13	25	TT	CC	CV129	321
NC0200106	5	124,2	13	26	CC	TT	CV129	241
NC0003210	6	38,4	14	27	CC	GG	CV183	129
NC0106527	6	56,4	14	28	CC	GG	CV183	356
NC0008833	6	70,9	15	29	CC	AA	CV162	179
NC0004030	6	85,5	16	30	GG	AA	CV162	312
NC0201579	6	88,0	15	31	AA	GG	CV162	91

NC0088767	6	99,0	16	32	CC	AA	CV162	536
NC0202487	6	103,0	17	33	CC	AA	CV162	377
NC0199561	6	118,1	17	34	TT	AA	CV162	728
NC0201942	7	34,5	18	35	CC	TT	CV129	271
NC0013158	7	48,6	19	36	GG	TT	CV162	382
NC0009409	7	51,2	18	37	CC	TT	CV129	294
NC0040322	7	64,5	20	38	AA	CC	CV162	41
NC0029362	7	78,4	19	39	TT	CC	CV162	106
NC0029362	7	78,4	20	39	TT	CC	CV162	106
NC0082612	8	78,9	21	40	AA	GG	CV174	309
NC0013946	8	84,0	21	41	GG	AA	CV174	59
NC0200572	8	95,6	22	42	GG	TT	CV162	270
NC0031630	8	125,1	22	43	CC	TT	CV162	645
NC0104512	10	57,3	23	44	TT	AA	CV129	79
NC0201713	10	71,7	23	45	CC	TT	CV129	145
NC0009486	10	105,5	24	46	TT	AA	CV183	166
NC0008643	10	119,1	24	47	GG	AA	CV183	241

[00216] Em vista do antecedente, será visto que as várias vantagens da invenção são alcançadas e atingidas.

[00217] As modalidades foram escolhidas e descritas a fim de melhor explicar os princípios da invenção e sua aplicação prática para assim permitir outros versados na técnica melhor utilizar a invenção em várias modalidades e com várias modificações contanto que adequadas ao uso particular contemplado.

[00218] Várias publicações de patente e não patente aqui, as revelações de cada uma destas é, na proporção necessária, incorporadas aqui por referência em suas totalidades.

[00219] Como várias modificações poderiam ser feitas nas construções e métodos aqui descritos e ilustrados sem se afastar do escopo da invenção, pretende-se que todo o assunto contido na descrição anterior ou mostrado nos desenhos em anexo seja interpretado como ilustrativo em vez de limitativo. A amplitude e escopo da presente invenção não deveriam ser limitados por quaisquer das modalidades exemplares acima descritas, mas deveriam ser definidos apenas de acordo com as reivindicações a seguir anexadas aqui e seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de identificar uma planta de milho compreendendo um ou mais alelos associados com resistência à podridão da espiga por diplodia (DER) ou com tolerância à DER em uma planta de milho, caracterizado pelo fato de que compreendendo:

(a) genotipar uma ou mais plantas de milho com um ou mais marcadores de ácido nucleico genômico de milho selecionado do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5, 6, 8-10, 18-20, 27, e 28, e

(b) selecionar com base na referida genotipagem uma ou mais plantas de milho compreendendo um alelo de um ou mais dos referidos marcadores de ácido nucleico que é associado com resistência ou tolerância à DER.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais plantas de milho genotipada na etapa (a) e/ou a uma ou mais plantas de milho selecionada na etapa (b) é uma planta de milho de uma população gerada por um cruzamento.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida genotipagem na etapa (b) é com cinco ou mais marcadores de ácido nucleico genômico de milho que são selecionados do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 5, 6, 8-10, 18-20, 27, e 28.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais plantas de milho selecionadas apresentam pelo menos tolerância a um fungo indutor de DER ou exibe pelo menos resistência a um fungo indutor de DER.

5. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a dita população é gerada por um cruzamento de uma ou mais plantas de milho resistente à DER com uma ou mais plantas de milho sensível à DER.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo fato de que compreende ainda a etapa (c) de ensaiar a planta de milho selecionada para resistência a um fungo indutor de DER.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de cruzar a planta de milho
5 selecionada na etapa (b) com outra planta de milho.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de obter semente da planta de milho selecionada na etapa (b).

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
10 pelo fato de que resistência ou tolerância é a um fungo indutor de DER selecionado do grupo que consiste em *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*.

10. Método de introgressão de um locus de resistência à podridão da espiga por diplodia (DER) em uma planta de milho,
15 caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) triar uma população de plantas de milho com um ou mais marcadores de ácido nucleico para determinar se uma ou mais plantas de milho da população contêm um locus de resistência à podridão da espiga por diplodia (DER) associado com um ou mais de SEQ ID NO:
20 5, 6, 8-10, 18-20, 27, e 28, e

(b) selecionar com base na referida triagem da referida população uma ou mais plantas de milho compreendendo o referido locus de resistência à DER.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que um ou mais dos marcadores fica
25 localizado dentro de 5 cm do alelo resistente.

12. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a dita população é uma população segregante.

30 13. Método de acordo com a reivindicação 10,

caracterizado pelo fato de que um ou mais dos marcadores fica localizado dentro de 100 Kb do alelo de resistência.

14. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que um ou mais dos marcadores exibe uma
5 contagem de LOD de mais que 2,0 com o dito locus de resistência à DER.

15. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que um ou mais dos marcadores é selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO: 5, 6, 8-10, 18-20,
10 27, e 28.

Locus de resistência à DER	Cromosomo	Posição (esquerda)	Marcador de flanqueamento esquerdo	Posição (direita)	Marcador de flanqueamento direito	LOD	Efeito aditivo	Efeito de predominância	Fonte resistente	Alelo de resistência (esquerdo)	Alelo de resistência (direito)	Geografia*
1	1	82.0	NC0009449	96.7	NC00025863	2.69	-2.1	-0.04	CV174	AA	AA	SA
6	3	179.7	NC0030587	204.2	NC0019414	2.21	1.51	1.96	CV183	AA	AA	AR, SA, US
9	4	95.1	NC0032557	109.2	NC0009620	2.44	-1.85	-1.31	CV174	CC	TT	SA
14	6	38.4	NC0003210	56.4	NC0106527	3.19	6.86	1.77	CV183	CC	CC	AR
14	6	38.4	NC0003210	56.4	NC0106527	2.10	3.99	2.62	CV183	CC	CC	US
14	6	38.4	NC0003210	56.4	NC0106527	3.87	3.81	0.99	CV183	CC	CC	AR, SA, US
21	8	78.9	NC0082612	84.0	NC0013946	2.63	-2.09	-1.11	CV174	AA	GG	SA
24	10	105.5	NC0009486	119.1	NC0008643	2.99	4.23	3.18	CV183	TT	GG	AR

FIG 1

Locus de resistência à DER	Cromosomo	Posição (esquerda)	Marcador de flanqueamento esquerdo	Posição (direita)	Marcador de flanqueamento direito	LOD	Efeito aditivo	Efeito de predominância	R ²	Fonte resistente	Alelo de resistência (esquerdo)	Alelo de resistência (direito)
4	3	14.2	NC0106389	88.0	NC0009470	2.6	-0.024	0.09	0.14	CV162	GG	GG
12	5	79.0	NC0111346	84.1	NC0040366	3.88	-0.03	-0.01	0.1	CV162	AA	AA
16	6	85.5	NC0004030	99.0	NC0088767	3.27	-0.028	0.015	0.09	CV162	GG	CC
20	7	64.5	NC0040322	78.4	NC0029362	4.02	-4.69	24.56	0.14	CV162	AA	TT

Locus de resistência à DER	Cromosomo	Posição (esquerda)	Marcador de flanqueamento esquerdo	Posição (direita)	Marcador de flanqueamento direito	LOD	Efeito aditivo	Efeito de predominância	R ²	Fonte resistente	Alelo de resistência (esquerdo)	Alelo de resistência (direito)
8	4	71.0	NC0201962	94.8	NC0105550	3.7129	7.0521	0	0.0326	CV162	TT	*****
19	7	48.6	NC0013158	78.4	NC0029362	7.8693	11.1742	0	0.075	CV162	GG	TT

FIG 3

Locus de resistência a DER	Cromosomo	Posição (esquerda)	Marcador de flaqueamento esquerdo	Posição (direita)	Marcador de flaqueamento direito	LOD	Efeito aditivo	Efeito de predominância	R ²	Fonte resistente	Alelo de resistência (esquerdo)	Alelo de resistência (direito)
7	4	21.7	NC0009057	46.8	NC0199875	5.7692	7.4721	0	0.0498	CV162	TT	TT

FIG 4

Análise	Cromosomo	Locus de resistência à DER	Posição	Marcador de flaqueamento esquerdo	Alelo de resistência esquerdo	Posição	Marcador de flaqueamento direito	Alelo de resistência direito	Efeito				
									LOD	Aditivo	Dom	R2	
De Predominância	2	1	36.5	NC0202428	AA	55.4	NC0201646	TT	2.91	-1.51	0.0	0.07	CV129
	3	2	83.2	NC0199309	AA	99.2	NC0199941	AA	3.46	1.87	0.0	0.09	CV162
	5	3	90.7	NC0110854	AA	107.6	NC0202210	TT	4.60	-1.81	0.0	0.10	CV129
Individual – Brasília	3	4	115.9	NC0201774	GG	125.7	NC0199741	GG	3.43	3.23	0.0	0.08	CV162
Individual - Pirasunnunga	3	4	115.9	NC0201774	GG	125.7	NC0199741	GG	4.20	1.50	0.0	0.11	CV162
Individual - Uberlândia	3	2	83.2	NC0199309	AA	99.2	NC0199941	AA	4.19	2.38	0.0	0.12	CV162
Individual – Brasília	5	3	90.7	NC0110854	AA	107.6	NC0202210	TT	5.59	-3.96	0.0	0.13	CV129

FIG 5

Locus de resistência à DER	Cromosomo	Posição (esquerda)	Marcador de flaqueamento esquerdo	Posição (direita)	Marcador de flaqueamento direito	LOD	Efeito aditivo	Efeito de predominância	R ²	Fonte resistente	Alelo de resistência (esquerdo)	Alelo de resistência (direito)	Geografia*
3	1	221.1	NC0015344	256.3	NC0016137	3.14	0.47	2.14	0.12	CV162	GG	CC	Brazil (South)
5	3	83.2	NC0199309	99.2	NC0199941	--	--	--	--	CV162	AA	AA	Brazil (Central)
10	4	99.9	NC0105197	120.8	NC0200096	4.87	-0.31	5.26	0.22	CV129	CC	GG	Brazil (Central)
11	5	65.2	NC0009668	81.3	NC0200395	7.52	-0.81	5.26	0.28	CV129	GG	GG	Brazil (Central)
15	6	70.9	NC0008833	88.0	NC0201579	4.59	0.13	5.04	0.19	CV162	CC	AA	Brazil (Central)
23	10	57.3	NC0104512	71.7	NC0201713	4.84	-0.08	4.97	0.20	CV129	TT	CC	Brazil (Central)

FIG 6