



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 204 343**

② Número de solicitud: 200301095

⑤ Int. Cl.7: **C12Q 1/68**  
// (C12Q 1/68  
C12R 1:77)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **01.03.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2004**

Fecha de la concesión: **28.06.2005**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:  
**15.10.2004**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.07.2005**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.07.2005**

⑯ Número de la solicitud inicial: **200200506**

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid  
Rectorado. Avda. de Séneca, 2  
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **González Jaén, María Teresa;  
Vázquez Estévez, Covadonga;  
Mirete Castañeda, Salvador y  
Patiño Álvarez, Belén**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Método de detección e identificación de cepas de *Fusarium verticillioides*.**

㉑ Resumen:

Método de detección e identificación de cepas de *Fusarium Verticillioides*.

El método de detección e identificación de cepas de *Fusarium Verticillioides* que se describe se basa en la utilización de una pareja de secuencias específicas de oligonucleótidos diseñadas a partir de la región IGS (región espaciadora intergénica de las unidades de rDNA). Esta pareja de oligonucleótidos permite detectar cepas de *F. Verticillioides* presentes en plantas agrícolas, en alimentos procesados y piensos contaminados. Los oligonucleótidos pueden ser usados como cebadores en reacciones de amplificación por PCR o como sondas en métodos basados en hibridación que permiten detectar y cuantificar la presencia de cepas de *F. Verticillioides*. La especificidad de las secuencias descritas permite la detección de forma sencilla, rápida, precisa y muy sensible de cepas de una especie fúngica que representa un riesgo para numerosos cultivos vegetales y para la salud humana y animal.

ES 2 204 343 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Método de detección e identificación de cepas de *Fusarium verticillioides*.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención, según se recoge en esta memoria descriptiva, se refiere a la utilización de técnicas basadas en el DNA para la detección de una especie de hongo patógeno de plantas agrícolas. Durante la colonización e infección la mayoría de las cepas de esta especie produce varias toxinas, de las que destacan las fumonisinas que producen efectos graves en la salud humana y animal. Las técnicas utilizadas hoy en día para la detección de estos hongos son ineficaces porque son laboriosas, requieren tiempo y considerable experiencia. Además, no permiten diferenciar cepas de una misma especie, por lo que es necesario determinar el perfil de producción de la toxina para confirmar si la cepa es o no productora utilizando un equipamiento sofisticado y costoso y comprobar su patogenicidad realizando laboriosos y largos ensayos de patogenicidad. La invención ofrece un método de detección de cepas de la especie *Fusarium verticillioides* rápido, preciso, fiable y con una elevada sensibilidad que no necesita un equipamiento costoso o elevada cualificación.

**Antecedentes**

*F. verticillioides* forma parte de un grupo de especies estrechamente relacionadas responsable de graves enfermedades que afectan a cultivos agrícolas importantes, con distribución prácticamente mundial, y que además, en el curso de la colonización y desarrollo de síntomas produce toxinas, algunas de las cuales son causa de enfermedades y dolencias crónicas en humanos y animales. Frecuentemente, la contaminación fúngica no es apreciable en los productos y, sin embargo, los niveles de toxinas son elevados. Ello hace que la detección de estas especies y su control sea fundamental para impedir la entrada de las toxinas en la cadena alimentaria, aunque en algunos casos no produzcan daños apreciables en los cultivos.

*F. verticillioides* es un patógeno que afecta principalmente a cereales, maíz, trigo y arroz, y su incidencia y gravedad varía en las distintas regiones agrícolas. Su incidencia, por ejemplo, en Estados Unidos es elevada y constituye uno de los patógenos más importantes. En España, se ha detectado sobre todo en Andalucía y Cataluña (de Andrés et al., 1998, Patógenos de Plantas descritos en España, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), sin embargo, se dispone de poca información debido a la difícil identificación de las especies de *Fusarium* y la poca atención oficial brindada hasta ahora a las toxinas de interés alimentario en España. La globalidad de la agricultura en relación a los recursos biológicos, las técnicas agrícolas y los tratamientos fitosanitarios empleados impiden el confinamiento de los patógenos que se convierten así en una amenaza potencial permanente en todas las regiones agrícolas.

La presencia de numerosas especies de hongos del género *Fusarium* asociadas a los cultivos complica la detección de las especies de riesgo, riesgo de desencadenar la enfermedad y riesgo de producción de toxinas. Dada la dificultad de identificar convenientemente las especies, sobre todo en el caso del grupo de especies que forman el complejo *Gibberella fujikuroi*, al que pertenece *Fusarium verticillioides*, es necesario disponer de métodos de diagnóstico rápidos y precisos para diseñar estrategias adecuadas de control.

Por otra parte, la etapa post-cosecha representa un riesgo adicional porque puede favorecerse el crecimiento y producción de las toxinas, aumentando sus niveles en la materia prima, niveles que no descienden apreciablemente durante el procesado posterior debido a la estabilidad de algunas toxinas, y de las fumonisinas en particular. La mayoría de las cepas de *F. verticillioides* son productoras de fumonisinas.

Las micotoxinas constituyen un grupo heterogéneo de sustancias producto del metabolismo secundario de multitud de hongos con incidencia en la salud humana, animal y vegetal, y por ello con repercusiones sanitarias económicas y medio ambientales de primer orden.

Las toxinas tienen un efecto pernicioso sobre la salud, no sólo en síndromes agudos producidos por altas dosis de la toxina sino por un efecto crónico producido por dosis bajas pero acumulativas. Esto es especialmente peligroso en toxinas con efectos cancerígenos y que están presentes en alimentos básicos de la dieta, como los cereales y zumos. Existe en la actualidad una preocupación creciente, tanto por parte de las autoridades sanitarias como de las industrias alimentarias, por garantizar la salubridad de los alimentos, especialmente en lo que se refiere a la ausencia de residuos tóxicos que, de una forma u otra, pueden llegar a los alimentos y transmitirse a los consumidores. Por ello, la legislación sobre presencia de toxinas y los límites permitidos se está revisando con urgencia en la actualidad para incluir nuevas toxinas y reducir los límites tolerables de cada una en alimentos de consumo.

Las toxinas fúngicas se pueden producir, dependiendo del hongo concreto, a lo largo de diferentes fases de la cadena alimentaria: proceso de colonización e infección del cultivo, durante el almacenaje y transporte o sobre los mismos alimentos elaborados. La detección de los hongos productores y de las toxinas principales en los puntos críticos de la cadena alimentaria es un tema esencial y prioritario para evitar la presencia de dichas toxinas en la dieta humana y animal. Por ello, estarían afectados diferentes niveles en la detección del hongo productor de la toxina: durante el cultivo, en los momentos previos al procesado (tras el almacenaje y el transporte) y durante la comercialización.

Las toxinas principales, por sus efectos, su incidencia en productos básicos y su estabilidad a lo largo de la elabo-

ración de los alimentos, son las producidas por los géneros *Fusarium* (fumonisinas, deoxynivalenol, nivalenol, toxina T2 y zearalenona), *Aspergillus* y *Penicillium* (aflatoxinas y ocratoxinas). Las primeras, se producen principalmente durante el cultivo (*pre-harvest*) coincidiendo con la colonización y el desarrollo de enfermedades en las plantas cultivadas. El segundo grupo de toxinas, producidas por *Aspergillus* y *Penicillium*, se producen durante la recogida y/o el almacenamiento (*post-harvest*), cuando se dan las condiciones favorables para el desarrollo de estos hongos.

En el primer caso, la prevención se limita al tratamiento con productos fitosanitarios. Estos productos, por sus efectos negativos sobre la salud y el medioambiente, también están sometidos a una legislación cada vez más restrictiva. En el segundo, la prevención consiste en la adición de conservantes y fungistáticos de eficacia variable y difícil aceptación por el consumidor. Por ello, la detección y el control de las cepas y especies capaces de producir alguna de las micotoxinas principales es un punto clave en las estrategias de control.

Las fumonisinas afectan principalmente a cultivos de cereales y frutos secos y no se eliminan tras el procesado de los alimentos y piensos. La presencia natural de fumonisinas en maíz, en sus derivados, así como en piensos ha sido estudiada con cierto detalle (Sydenham *et al.* 1991, Fumonisin contamination of commercial com-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 39: 2014-2018; Pestka *et al.*, 1994, Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. *J. Food Prod.* 57: 169-172; Schneider *et al.* 1995, Rapid detection of fumonisin B<sub>1</sub>, in corn-based food by competitive direct dipstick enzyme immunoassay/enzyme-linked immunofiltration assay with integrated negative control reaction. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2548-2552), de igual modo, se ha estudiado la presencia de estas toxinas en ciertos alimentos como la leche (Maragos *et al.* 1994, Quantitation and stability of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in milk, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 77: 1162-1167) y la cerveza (Scott and Lawrence 1995 Analysis of beer for fumonisins, *J. Food Prot.* 58: 1379-1382). En España en particular existen pocos estudios sobre fumonisinas en alimentos de consumo humano y animal. Se ha estudiado la capacidad de producir fumonisinas por especies de *Fusarium* aisladas de cereales y se ha determinado su contenido en alimentos y piensos en los mercados españoles (Sala *et al.* 1994, Fumonisin producing capacity of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain. *J. Food Prot.* 57: 915-917; Sanchís *et al.* 1994, Occurrence of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn-based products from the Spanish market. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2147-2148; Sanchís *et al.* 1995, Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> and toxigenic *Fusarium* strains in feeds from the Spanish market. *Int. J. Food Microbiol.* 27: 37-44). Estos datos han puesto de manifiesto que la mayoría de las cepas de *Fusarium* aisladas son capaces de producir fumonisinas.

Las fumonisinas fueron descritas por primera vez por Bezuidenhout et al en 1988 (Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 743-745.). Son responsables de una gran variedad de síntomas en animales como la leucoencefalopatía en caballos, edemas pulmonares en cerdos, cáncer de hígado en ratas (Riley *et al.* 1993, Fungal toxins in food: recent concerns. *Ann. Rev. Nutr.* 13: 167-189) y son uno de los agentes causales de cáncer de esófago en humanos (Gelderblom *et al.*, 1988, Fumonisin novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1806-1811).

Las fumonisinas son producidas por especies del género *Fusarium* que se agrupan en el denominado complejo de especies de *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito & K. Kimura, entre ellas destacan las especies *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg y *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, por los elevados niveles de toxina que producen así como porque afectan principalmente a cereales. La identificación de las especies de *Fusarium* se realiza en base a caracteres morfológicos y a claves taxonómicas diversas así, según los diferentes autores, se pueden distinguir 2, 6, 36 ó más especies diferentes (O'Donnel *et al.*, 1998, Molecular systematics and phylogeographic of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-493). Estas diferencias han dificultado, si no se tiene un gran conocimiento en la taxonomía de este grupo, la denominación correcta de las cepas que son importantes como patógenos o como productores de metabolitos de interés económico, entre ellos las micotoxinas. Por otra parte, debemos considerar que este método de identificación es laborioso, requiere tiempo, considerable experiencia y no permite diferenciar cepas de una misma especie, por lo que, una vez determinada la especie, es preciso analizar el espectro de producción de toxinas y el perfil de una toxina en concreto para confirmar si la cepa es productora o no. Hay por ello una necesidad urgente de desarrollar métodos relativamente rápidos, fiables y con gran especificidad.

Las técnicas de diagnóstico basadas en el DNA son una alternativa eficaz debido a su exquisita sensibilidad, rapidez, precisión y a que no requieren un equipo costoso o personal muy especializado. Estas técnicas de detección se basan en el conocimiento de secuencias de DNA específicas de una cepa o especie que se obtiene a partir de estudios comparativos de la secuencia nucleotídica de fragmentos de DNA concretos, codificadores o no de proteínas, entre numerosas cepas y especies. Por lo general, van asociadas a técnicas de detección mediante PCR o hibridación.

El objeto general de esta patente es la obtención de secuencias de DNA específicas de las principales especies del género *Fusarium* de interés por su capacidad de producir enfermedades de interés agronómico. En esta patente se presentan las primeras secuencias específicas que permiten identificar la especie *F. verticillioides*. Las secuencias diagnósticas que presentamos se basan en la región IGS, región espaciadora intergénica de las unidades repetidas en tándem del DNA ribosómico.

### Explicación de la invención

La presente invención se refiere a la detección e identificación de cepas de *Fusarium verticillioides* y recoge las

## ES 2 204 343 B2

secuencias específicas de oligonucleótidos necesarias para ello y secuencias más largas de donde se han obtenido dichos oligonucleótidos específicos.

Los estudios previos que sirvieron de base a las secuencias que se presentan tenían como objeto conocer las relaciones genéticas y el grado de parecido de las especies principales del complejo de especies *G. fujikuroi* y, dentro de la especie de interés *F. verticillioides*, de numerosas cepas de diversa procedencia geográfica y diferentes hospedadores, así como de otras especies del género *Fusarium* más o menos próximas. El análisis se realizó mediante la técnica PCR-RFLP de la citada región IGS (Mirete et al. 2003. Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. International Journal of Food Microbiology, en prensa; Patiño et al. 2001, Genetic relationships of fumonisin producing isolates of *Gibberella fujikuroi* complex from *Pinus pinea*. International Symposium. Bioactive fungal metabolites. Swansea. 22-27 de abril; Mirete et al. 1998, Caracterización de diversos aislamientos de *Fusarium moniliforme* asociados a *Pinus pinea*, IX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Salamanca 19-23 de octubre). Este análisis permitió detectar agrupamientos de cepas lo que facilitó la elección de las cepas idóneas y representativas para realizar los estudios pertinentes de secuenciación nucleotídica de la región IGS. El análisis comparativo realizado de las secuencias nucleotídicas permitió diseñar parejas de oligonucleótidos específicos de *F. verticillioides* para ser utilizados como cebadores en reacciones de PCR sobre DNA genómico.

Esta invención presenta una pareja de oligonucleótidos cebadores que se han probado con numerosas cepas de *F. verticillioides* de diversa procedencia geográfica y de hospedador, las especies principales del complejo de especies de *G. fujikuroi* y varias especies de *Fusarium* más o menos próximas de otras Secciones taxonómicas (Tabla 1). Las figuras 1 y 2 muestran los resultados obtenidos para todas ellas según se detalla en los ejemplos 1 y 2.

TABLA 1

Cepas de *Fusarium* analizadas indicando hospedador, origen y la amplificación positiva (+) o negativa (-) por PCR con los oligonucleótidos específicos de *Fusarium verticillioides* VERT-1/VERT-2, caracterizados por SEQ ID NO: 1 y 2. Cepas suministradas por A. Logrieco (CNR, Bari, I)(\*); cepas de *F. verticillioides* suministradas por Tavora (Lisboa, P)(\*\*); cepas de *F. verticillioides* suministradas por M. Jiménez (UV, Valencia, Sp)(\*\*\*); cepas de las especies de *G. fujikuroi* (#); cepas de *F. verticillioides* suministradas por el Fusarium Research Center (USA) (§); cepas de *Fusarium* sp. strains suministradas por A. Martínez (CIB, Madrid, Sp)(¶).

	CEPA	ORIGEN	HOSPEDADOR	VERT 1/2	
35	1	<i>F. verticillioides</i> A0999 #	USA	<i>Zea mays</i>	+
	2	<i>F. sacchari</i> B3852 #		Lab. Cross	-
	3	<i>F. fujikuroi</i> C1993 #	Taiwan	<i>Oryza sativa</i>	-
40	4	<i>F. proliferatum</i> D4853 #		Lab. Cross	-
	5	<i>F. subglutinans</i> E2159 #	USA	<i>Zea mays</i>	-
45	6	<i>F. thapsinum</i> F4094 #		Lab. Cross	-
	7	<i>F. nygamai</i> G05112 #		Lab. Cross	-
	8	<i>F. circinatum</i> NRRL25333#	Sudáfrica	<i>Pinus patula</i>	-
50		<i>F. verticillioides</i>			
	9	FV 33*	Italia	<i>Ostrinia nubilalis</i>	+
55	10	FV 36*	Italia	<i>Ostrinia nubilalis</i>	+
	11	FV 31*	España	<i>Triticum</i>	+
	12	FV 6*	Italia	<i>Triticum</i>	+
60	13	FV 37*	Italia	<i>Cucumis melo</i>	+
	14	Gf2***	España	<i>Zea mays</i>	+
65	15	Gf8***	España	<i>Zea mays</i>	+

# ES 2 204 343 B2

TABLA (continuación)

	CEPA	ORIGEN	HOSPEDADOR	VERT 1/2	
5	16	Gf11***	España	<i>Zea mays</i>	+
	17	Gf20***	España	<i>Zea mays</i>	+
10	18	CB186**	Portugal	<i>Zea mays</i>	+
	19	CB184**	Portugal	<i>Zea mays</i>	+
	20	FV 13*	Italia	<i>Zea mays</i>	+
15	21	FV 8*	USA	<i>Zea mays</i>	+
	22	FV 9*	USA (Sesia)	<i>Zea mays</i>	+
20	23	FV 10*	USA (Asgrow)	<i>Zea mays</i>	+
	24	FV 3*	Perú	<i>Zea mays</i>	+
	25	FV 18*	China	<i>Zea mays</i>	+
25	26	FV 42*	USA (Dekalb)	<i>Zea mays</i>	+
	27	FV 21*	China	<i>Zea mays</i>	+
30	28	FV 46*	Rusia	<i>Zea mays</i>	+
	29	FV 65*	Sudáfrica	<i>Zea mays</i>	+
	30	FV 20	China	<i>Zea mays</i>	+
35	31	FV 38*	Sudáfrica	<i>Zea mays</i>	+
	32	FV 26*	Argentina	<i>Zea mays</i>	+
40	33	ITEM-1934*	España	<i>Zea mays</i>	+
	34	ITEM-2181*	USA	<i>Zea mays</i>	+
	35	ITEM-2241*	Rusia	<i>Zea mays</i>	+
45	36	ITEM-2243*	Rusia	<i>Zea mays</i>	+
	37	ITEM-2259*	Italia	<i>Zea mays</i>	+
50	38	ITEM-1773*	Italia	<i>Zea mays</i>	+
	39	ITEM-2639*	Eslovaquia	<i>Zea mays</i>	+
55	40	ITEM-2703*	USA	<i>Zea mays</i>	+
	41	FV 5*	Ecuador	<i>Musa sapientum</i>	+
	42	Gf5***	Ecuador	<i>Musa sapientum</i>	+
60	43	Gf16***	Ecuador	<i>Musa sapientum</i>	+
	44	Gf0***	Ecuador	<i>Musa sapientum</i>	+
	45	Gf1 ***	Ecuador	<i>Musa sapientum</i>	+
65	46	ITEM-1256*	España	<i>Musa sapientum</i>	+

## ES 2 204 343 B2

TABLA (continuación)

	CEPA	ORIGEN	HOSPEDADOR	VERT 1/2	
5	47	ITEM-1149*	Panamá	<i>Musa sapientum</i>	+
	48	ITEM-1249*	España	<i>Musa sapientum</i>	+
10	49	ITEM-1252*	España	<i>Musa sapientum</i>	+
	50	ITEM-1143*	Ecuador	<i>Musa sapientum</i>	+
	51	ITEM-1146*	Ecuador	<i>Musa sapientum</i>	+
15	52	ITEM-1245*	España	<i>Musa sapientum</i>	+
	53	ITEM-1251*	España	<i>Musa sapientum</i>	+
20	54	ITEM-1145*	Ecuador	<i>Musa sapientum</i>	+
	55	ITEM-1150*	Panamá	<i>Musa sapientum</i>	+
	56	ITEM-1139*	Panamá	<i>Musa sapientum</i>	+
25	57	ITEM-1144*	Ecuador	<i>Musa sapientum</i>	+
	58	ITEM-1243*	España	<i>Musa sapientum</i>	+
30	59	M-7451 <sup>§</sup>	Nepal	<i>Zea mays</i>	+
	60	M-7450 <sup>§</sup>	Nepal	<i>Zea mays</i>	+
	61	M-7442 <sup>§</sup>	Nepal	<i>Zea mays</i>	+
35	62	M-5500 <sup>§</sup>	Nepal	<i>Zea mays</i>	+
	63	M-5507 <sup>§</sup>	Nepal	<i>Zea mays</i>	+
40	64	M-5515 <sup>§</sup>	Nepal	<i>Zea mays</i>	+
	65	<i>Foxysporum radices lycopersici</i>	España	<i>Lycopersicon</i>	-
45	66	Gf 49 ( <i>F. subglutinans</i> )* <sup>***</sup>	Ecuador	<i>Musa</i>	-
	67	<i>F. oxysporum</i> (681)☒			-
	68	<i>F. oxysporum</i> (695)☒			-
50	68	<i>F. acuminatum</i> (690)☒			-
	70	<i>F. sambucinum</i> (688)☒			-
55	71	<i>F. semitectum</i> (691)☒			-
	72	<i>F. heterosporum</i> (694)☒			-
60	73	<i>F. culmorum</i> (678)☒			-

Las pruebas mencionadas, por el número de cepas probadas y por su representatividad del rango de diversidad de la especie *F. verticillioides* y de especies del grupo *G. fujikuroi*, confirman la especificidad y eficacia que brindan la pareja de oligonucleótidos objeto de esta patente en la identificación de esta especie. Estas secuencias pueden utilizarse acompañadas de un protocolo de PCR clásico para proceder a una detección cualitativa partiendo de DNA genómico aislado por el procedimiento que se prefiera, o de otros protocolos que ofrezcan ventajas adicionales, como poder cuantificar la proporción en que se encuentra esa especie o cepa en el conjunto de una población contaminante de hongos en los tres niveles descritos anteriormente: planta infectada, semilla almacenada o alimento elaborado.

## ES 2 204 343 B2

Asimismo, las secuencias SEQ ID NO: 1 y 2 de los dos oligonucleótidos VERT pueden utilizarse para diseñar sondas marcadas que permitan la detección de cepas de *F. verticillioides* en sistemas de hibridación tanto sobre extractos con DNA genómico como *in situ* sobre núcleos de las hifas.

5 La utilización de métodos de PCR en placas permite el escrutinio de muestras partiendo de cantidades mínimas de material fúngico (esporas o micelio) con los oligonucleótidos propuestos.

Los oligonucleótidos específicos de *F. verticillioides* objeto de esta patente son VERT-1 y VERT-2, caracterizados por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente.

10 Aquellos oligonucleótidos que representen versiones más cortas o largas de los mismos se consideran también incluidos en la presente invención en la medida que son específicos de esta región IGS para las cepas de *F. verticillioides*. Asimismo se incluye la secuencia del producto de amplificación, caracterizada por SEQ ID NO: 3, que incluye los oligonucleótidos caracterizados por SEQ ID NO: 1 y 2.

15 Protocolo de detección de *F. verticillioides*

El mantenimiento de los hongos objeto de esta patente se ha realizado mediante el cultivo y siembra periódica en placas Petri con medio Patata-Dextrosa-Agar (PDA, Scharlau). Para la obtención de micelio, se inocularon matraces con 20 ml de medio Sabouraud y se incubaron a 26°C en oscuridad y en cultivo estático durante 3 días. Como inóculo se utilizaron discos de cultivos de 7 días en medio sólido (PDA). Al cabo de este tiempo, el micelio se filtra a través de papel Whatman n° 1, se lava y se congela inmediatamente en nitrógeno líquido. Se mantiene congelado a -80°C hasta el momento de la extracción de DNA. Para la extracción de DNA se utiliza 1g de micelio congelado mediante el kit de extracción rápida de DNA (Genomix de TALENT), el protocolo de extracción rápida de hongos (Cenis, 1992, Rapid Extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucl. Acid. Res. 20: 2380) o el método de extracción de DNA de plantas (Dellaporta et, 1983, A plant DNA minipreparation: A version. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19- 21) o, eventualmente, de material vegetal o alimento contaminado.

30 En la reacción de detección por PCR, la mezcla de reacción utilizada para un volumen total de 25  $\mu$ l es la siguiente: 3  $\mu$ l de DNA (50-140 ng), 12.5 nM de cada uno de los cuatro dNTPs, 50 nM de MgCl<sub>2</sub>, 10 nM de cada cebador VERT-1 y VERT-2 (SEQ ID NO: 1 y 2), una unidad de Taq polimerasa y 2.5  $\mu$ l del tampón 10x suministrado por el fabricante (Ecogen).

35 Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 1 min 25 seg a 94°C, 25 ciclos de 35 seg a 95°C (desnaturalización), 30 seg a 64°C (anillamiento), 2 min a 72°C (extensión) y finalmente 1 ciclo de 5 min a 72°C (extensión final). La temperatura de anillamiento se puede elevar o bajar 1 grado. El tiempo de anillamiento es crítico. Termociclador utilizado: PTC-100 (MJ-research Inc) Thermocycler o Eppendorf Mastercycler Gradient.

40 Los productos de amplificación se detectaron mediante geles de agarosa al 1.5% en TAE (Tris acetato 40mM y EDTA 1,0 mM). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1  $\mu$ g/ml) y se visualizaron mediante luz ultravioleta. Como patrón de masa molecular se utilizó el marcador *100 bp Ladder Plus* (MBI fermentas). Para la visualización son suficientes 2 ó 3  $\mu$ l de la mezcla de PCR.

### Breve descripción de las figuras

45 Figura 1

50 Visualización de los productos de amplificación obtenidos con oligonucleótidos específicos de *F. verticillioides* según el ejemplo 1. Aparece un solo producto de amplificación de alrededor de 750 pb sólo en las cepas de *F. verticillioides* (Gf 1, Gf 2, Gf 8, Gf 10, Gf 11, Gf 20, CB 186, CB 184, FV 13, FV 8, FV 5, carriles 1-11) y *mating populations* A (carril 12). No aparece banda en las cepas del resto de los *mating populations* (B, C, D, E, F, G y H, carriles 13-19). La M indica el marcador de masa molecular.

55 Figura 2

60 Visualización de los productos de amplificación obtenidos con oligonucleótidos específicos de *F. verticillioides* según el ejemplo 2. Aparece un solo producto de amplificación de 750 pb solamente en las cepas de *F. verticillioides* (FV 36, FV 3, FV 65, FV 38, FV 9, FV 26, carriles 1-6), que no aparece en las otras especies de *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. acuminatum*, *F. sambucinum*, *F. reticulatum*, carriles 8-13). La M indica el marcador de masa molecular.

### Modo de realización de la invención

65 La presente invención se ilustra adicionalmente con los ejemplos que se exponen a continuación.

**Ejemplos**

Ejemplo 1

5 *Identificación de F. verticillioides utilizando oligonucleótidos específicos*

10 Siguiendo el protocolo de detección de *F. verticillioides* descrito en la explicación de la presente invención, se analizaron cepas de *Fusarium verticillioides* y del complejo *Gibberella fujikuroi* que incluye las denominadas principales especies biológicas (Leslie, 1995. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. Can. J. Bot. 73: S282-S291): *F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *F. nygamai* y *F. circinatum*.

15 Mediante la técnica de PCR, utilizando los oligonucleótidos VERT-1 y VERT-2, caracterizados por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, se obtuvo un único producto de amplificación de aproximadamente 750 pb en el caso de las cepas de *F. verticillioides*. No apareció ningún producto de amplificación en las cepas de las demás especies del complejo *G. fujikuroi* (figura 1).

Ejemplo 2

20 *Identificación de F. verticillioides utilizando oligonucleótidos específicos*

25 Siguiendo el protocolo de detección de *F. verticillioides* descrito en la explicación de la presente invención, se analizaron cepas de *F. verticillioides* y de otras especies pertenecientes al género *Fusarium* incluyendo *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. acuminatum*, *F. semitectum* y *F. reticulatum*.

30 Mediante la técnica de PCR, utilizando los oligonucleótidos VERT-1 y VERT-2, caracterizados por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, se obtuvo un único producto de amplificación de aproximadamente 750 pb a partir de las cepas de *F. verticillioides* pero no a partir de las otras especies de *Fusarium* analizadas (figura 2).

35

40

45

50

55

60

65



REIVINDICACIONES

5 1. Método de detección e identificación de cepas de *Fusarium verticillioides*, **caracterizado** por la utilización de los oligonucleótidos determinados por SEQ ID NO: 1 y 2 ó versiones más cortas o largas de los mismos.

10 2. Método de detección e identificación de cepas de *Fusarium verticillioides*, **caracterizado** por la utilización de oligonucleótidos, según reivindicación 1, en reacciones de PCR para la detección cualitativa de especies de *Fusarium verticillioides*.

10 3. Método de detección e identificación de cepas de *Fusarium verticillioides*, **caracterizado** por la utilización de oligonucleótidos, según reivindicación 1, en reacciones de PCR para la cuantificación de la proporción de especies de *Fusarium verticillioides* en poblaciones de hongos a nivel de planta infectada, semilla almacenada o alimento elaborado.

15 4. Método de detección e identificación de cepas de *Fusarium verticillioides*, **caracterizado** por la utilización de oligonucleótidos, según reivindicación 1, en el diseño de sondas para detectar especies de *Fusarium verticillioides* en sistemas de hibridación.

20

25

30

35

40

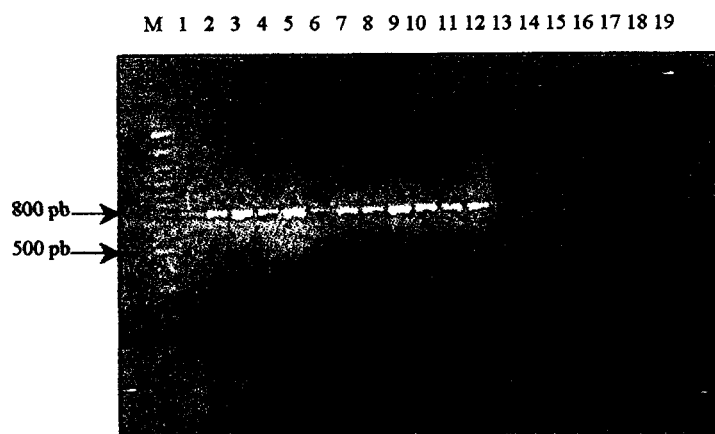
45

50

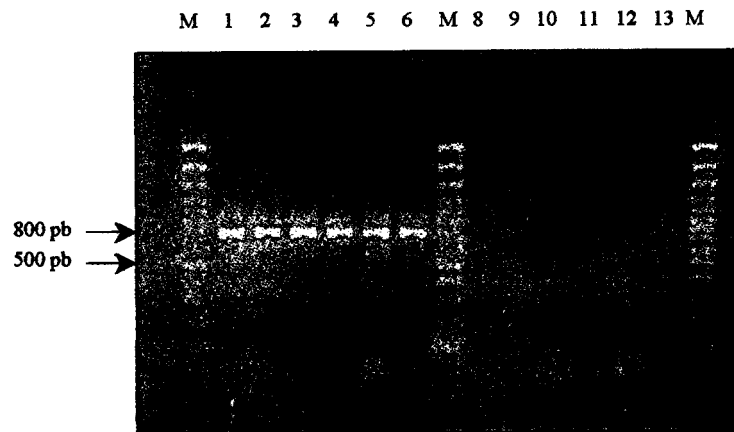
55

60

65



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**

# ES 2 204 343 B2

## LISTA DE SECUENCIAS

<110>	Universidad Complutense de Madrid	
5	<120> Método de detección e identificación de cepas de <i>Fusarium verticillioides</i>	
	<160> 3	
10	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> <i>Fusarium verticillioides</i>	
15	<400> 1	
20	GTCAGAATCC ATGCCAGAAC G	21
	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> <i>Fusarium verticillioides</i>	
	<400> 2	
30	CACCCGCAGC AATCCATCAG	20
	<210> 3	
35	<211> 752	
	<212> DNA	
	<213> <i>Fusarium verticillioides</i>	
40	<400> 3	
	GTCAGAATCC ATGCCAGAAC GCGGTGATAC CACCCGCAGC TATAGATGGA CAAGAATAGG 60	
45	CTTCGGCTTA GCGTCTTAGC AGGCGATTCT TCCACGGCGC TCGAAGCGCG TCGTGGTATT 120	
	TCGCGTATTG TAATTTCAAC ACGACCGGGG TCAAACGGTC CTGTAAGCAG TAGAGTAGCC 180	
	TTGTTGTTAC GATCTGCTGA GGGTAAGCCG TCCTTCGCCT CGATTTCCCC AATGGGTTCT 240	
50	CCGGATTTCT GGAGACTTGT AGGGGTTGTG GGCTTTTTTT CGAGATGTCG TCTCCGGACG 300	
	GGCGGTGCAG GGTAGTCGAG TTGGACTTGG TGAATTCGA TTCCTTCGAG TCTGGCACGA 360	
55	TTGTGTGCGG CTGTGTGTTG GACGGTGCAG GGTAGGCTAC TCAGTCTTGG TCGATTTCGAG 420	
	GATCGATTCT GGGGCTGAGT GGCAGCTGTG TGTGAGGGAT GGGGTCTAGG GTAGGCCTGA 480	
60	TTTGTCTTGG TCGAATCTGA TGTCGGCCGC CGTGTAGGAC GGAACGATGG TGGTGCAAGG 540	
	TAACTATAGG GTAGGCAGCT TAGACTTGGT CGATCTGGGT GTCGGTTTCC CTGGCTGGCG 600	
65	GGTCTGAGGT CGTCGAGACG AGATACGAGT GGTGCAGGGT AAGCAGCTTC TGTACCTGCC 660	

ES 2 204 343 B2

AGGAAGCGAT TCGGGTCTAG ATGTGTGGTC TAGGTTAGGT ACAGGGTAGG CGAGTTTCCA 720

5

GTCTCGTCGC TGATGGATTG CTGCGGGTGT AG

752

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 204 343

② Nº de solicitud: 200301095

③ Fecha de presentación de la solicitud: 01.03.2002

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12Q 1/68 // (C12Q 1/68, C12R 1:77)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	MIN, B.-R. "PCR-RFLP and sequencing analysis of rDNA IGS in <i>Fusarium</i> sp." 9 diciembre 2001 EMBL/GENEBANK DATABASES [en línea] [recuperado el 04.12.2003]. Accession nº AF439332, Sequence identification AF439332.1	1
A		2-5
Y	CARBONE et al. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. <i>Mycologia</i> , 1999, Vol. 91, nº 3, páginas 553-556.	1
A		2-5
Y	APPEL et al. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of <i>Fusarium oxysporum</i> based on partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. <i>Molecular Plant Microbe Interactions</i> , 1996, Vol. 9, nº 2, páginas 125-138.	1
A		2-5
A	GRIMM C. et al. R. A PCR-ELISA for the detection of potential fumonisin producing <i>Fusarium</i> species. <i>Lett Appl Microbiol.</i> , 1998, Jun., 26 (6): 456-62.	1-5

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

29.01.2004

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1