

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 905**

21 Número de solicitud: 201031615

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12R 1/77** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **03.11.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**02.08.2012**

71 Solicitante/s:  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC)  
SERRANO, Nº 117  
28006 MADRID, ES y  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

72 Inventor/es:  
**LANDA DEL CASTILLO, BLANCA B.;  
MONTES BORREGO, MIGUEL;  
NAVAS CORTÉS, JUAN ANTONIO;  
JIMÉNEZ DÍAZ, RAFAEL M. y  
JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, DANIEL**

74 Agente/Representante:  
**Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **MÉTODO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS RAZAS PATOGENICAS DEL HONGO  
FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. CICERIS.**

57 Resumen:

Método de detección y cuantificación de las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

La presente invención proporciona un método, basado en PCR convencional o cuantitativa en tiempo real (qPCR), fiable, rápido, exacto y reproducible para la detección y cuantificación de cualesquiera de las ocho razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6) en una muestra biológica aislada. Dicho método permite la detección y cuantificación de, como mínimo, 1 pg de ADN del patógeno en muestras biológicas complejas incluyendo diferentes tejidos de la planta de garbanzo y suelos infestados, sin que su exactitud y eficacia se vea alterada. La invención también se refiere a dos parejas de cebadores útiles para llevar a cabo el método de la invención.

ES 2 385 905 A1

**DESCRIPCIÓN**

**Método de detección y cuantificación de las razas patogénicas del hongo**

***Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris***

La presente invención se encuadra en el campo de la biología molecular y la agricultura, específicamente dentro de los métodos basados en PCR para la  
5 detección y cuantificación de las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en muestras biológicas aisladas de plantas de garbanzo y en suelo.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una fuente importante de alimentación humana y animal, y ayuda a incrementar la fertilidad del suelo, especialmente en zonas áridas y tropicales semiáridas donde se concentra su producción.  
15 Está descrito como el tercer cultivo de leguminosas en importancia en el mundo después de la judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y el guisante (*Pisum sativum* L.). La Fusariosis Vascular del garbanzo, causada por *F. oxysporum* Schlechtend. emend W. C. Snyder. & H. N. Hans. f. sp. *ciceris* (Padwick) W. C. Snyder & H. N. Hans., es la enfermedad más importante de las originadas por patógenos  
20 que habitan en el suelo que limita la producción de garbanzo en todo el mundo, pero principalmente en la cuenca mediterránea y el subcontinente indio. Las pérdidas anuales de rendimiento por esta enfermedad se han estimado entre el 10 y el 15%, pero las epidemias de Fusariosis Vascular pueden ser devastadoras causando pérdidas del 100% en condiciones favorables. En  
25 particular, los ataques de la enfermedad son devastadores si se producen bajo condiciones de cultivo de alta temperatura y estrés hídrico durante las fases de reproducción y llenado de semilla.

*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* muestra una alta variabilidad patogénica. Hasta la  
30 fecha se han descrito ocho razas patogénicas en *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (razas 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6) (Cabrera de la Colina *et al.*, 1985, *Int. Chickpea Newsl.*, 13:24-26; Haware y Nene, 1982, *Plant Disease*, 66: 809-810;

Jiménez-Díaz *et al.*, 1993, *Proc. 3<sup>rd</sup> Eur. Sem. Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance, Radzików, Poland: Plant Breeding and Acclimatization Institute*, pp 87-94), las cuales pueden ser agrupadas dentro de los patotipos de marchitez y amarillez basándose en los síntomas que inducen en ensayos de patogenicidad. El patotipo de amarillez induce un progresivo amarillamiento foliar con decoloración vascular, seguida por la muerte de la planta en los 40 días después de la inoculación. El patotipo de marchitez induce clorosis severa y flacidez, decoloración vascular y muerte de la planta en los 20 días después de la inoculación. Las razas 0 y 1B/C pertenecen al patotipo de amarillez y se consideran menos virulentas en comparación con las razas 1A y 2 a 6 que pertenecen al patotipo de marchitez y son consideradas más virulentas. Las razas 2, 3 y 4 sólo han sido descritas en la India, mientras que las razas 0, 1 B/C, 5 y 6 se encuentran principalmente en la cuenca mediterránea y en California. La raza 1A ha sido descrita en la India, California, y la cuenca mediterránea.

La utilización de cultivares resistentes es una de las pocas medidas disponibles y la más eficaz para el manejo de la Fusariosis Vascular del garbanzo, sin embargo, su uso no se encuentra muy extendido debido a la presencia de características agronómicas indeseables en algunos de los cultivares desarrollados, y a la alta variabilidad patogénica existente en las poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* que podría limitar la eficacia o el uso extensivo de la resistencia disponible. Se han identificado varias fuentes de resistencia raza-específica a la Fusariosis Vascular y han sido utilizadas en varios programas de mejora de garbanzo, los cuáles han permitido desarrollar un número limitado de germoplasma de garbanzo con resistencia operativa frente a razas específicas de este patógeno. Aunque la caracterización de razas patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* está bien establecida, la genética de la resistencia a cada una de estas razas no ha sido completamente aclarada aún. Por consiguiente, la caracterización adecuada de la resistencia de las líneas y cultivares de garbanzo a las razas específicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es esencial para la utilización de la resistencia.

Mientras que los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* pueden ser identificados o asignados a razas mediante diferentes protocolos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (García-Pedrajas *et al.*, 1999, *European Journal of Plant Pathology*, 105:251–259; Jiménez-Gasco *et al.*, 5 2001, *European Journal of Plant Pathology*, 107:237–248; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003, *Phytopathology*, 93:200-209; Kelly *et al.*, 1998, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52:397-409; ES2193861 B1), la caracterización de las reacciones de resistencia en germoplasma de garbanzo depende de los tradicionales bioensayos de patogenicidad. Este método de 10 caracterización de resistencia es sencillo conceptualmente pero costoso en tiempo (de 50 a 60 días), instalaciones y recursos necesarios. Además, el desarrollo de la enfermedad durante la tipificación patogénica puede verse influido por varios factores (por ejemplo, la humedad del suelo y la densidad de inóculo del patógeno), así como por la temperatura, la cuál se ha demostrado 15 que puede influir en la expresión de resistencia o susceptibilidad de cultivares de garbanzo a la Fusariosis Vascular. En consecuencia, la falta de ajuste de estas fuentes de variabilidad puede llevar a la incorrecta identificación de razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* o a la apreciación errónea de resistencia en genotipos de garbanzo. Por lo tanto, son necesarios nuevos métodos para la 20 identificación rápida, fiable y reproducible, y para la cuantificación, del patógeno en los tejidos vegetales, principalmente en el tallo, lo cuál sería una evidencia de infección vascular, y por consiguiente, podría facilitar la evaluación de la respuesta de resistencia completa de los genotipos de garbanzo a sus razas patogénicas. Por otra parte, también sería útil disponer de un método para 25 cuantificar el inóculo del patógeno en el suelo y ayudar así en la elección de suelos libres o con bajos contenidos de inóculo del patógeno y el uso de semillas de garbanzo libres de éste.

Los protocolos de PCR cuantitativa han permitido la cuantificación exacta e independiente de medios de cultivos de una variedad microorganismos 30 asociados al suelo o a plantas, incluyendo patógenos de plantas de tejidos vegetales, semillas y suelos. En diversos estudios, en los que se ha utilizado una amplia colección de aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de todo el

mundo, se han desarrollado metodologías de PCR basadas en la Amplificación Polimórfica al Azar del ADN (RAPD), así como en cebadores específicos, que permiten la caracterización de la *forma specialis ciceris* de *F. oxysporum*, sus patotipos y algunas de las ocho razas descritas del patógeno (García-Pedrajas  
5 *et al.*, 1999, *European Journal of Plant Pathology*, 105:251–259; Kelly *et al.*, 1998, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52:397-409; ES2193861 B1; Jiménez-Gasco *et al.*, 2001, *European Journal of Plant Pathology*, 107:237–248; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003, *Phytopathology*, 93:200-209). No obstante, aunque algunos de estos protocolos se han desarrollado  
10 para ser aplicados tanto en planta como en suelo (Kelly *et al.*, 1998, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52:397-409; ES2193861 B1; García-Pedrajas *et al.*, 1999, *European Journal of Plant Pathology*, 105:251–259), la principal limitación de éstos es que no permiten cuantificar el patógeno en el suelo o su nivel de infección en la planta. Solventar esta limitación sería  
15 particularmente útil para: (i) discriminar entre germoplasma de garbanzo resistente y susceptible en programas de mejora mediante la cuantificación de las infecciones sintomáticas y asintomáticas, (ii) correlacionar la cantidad de patógeno en los tejidos de plantas infectadas con el nivel posterior de desarrollo de la enfermedad (expresión de síntomas) en germoplasma  
20 resistente o tolerante y/o el uso posterior de otras medidas (biológicas, físicas o químicas) de control de la enfermedad, y (iii) la selección de suelos de cultivo con cantidades no detectables o mínimas del agente patogénico.

Por tanto, la disponibilidad de un protocolo para detectar y cuantificar  
25 cualesquiera de las ocho razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en el suelo y en tejido de garbanzo puede ser de gran importancia en estudios epidemiológicos, cuarentena y programas de mejora genética para el desarrollo de resistencia raza-específica a la Fusariosis Vascular.

30 Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar un protocolo que permita identificar selectivamente aislados pertenecientes a cualesquiera de las ocho razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, frente a aislados no patogénicos de *F.*

*oxysporum*, frente a otras *formae speciales* de *F. oxysporum* y frente a otros *Fusarium* spp., en muestras ambientales complejas como tejidos de la planta y suelo, y que al mismo tiempo permita la cuantificación del ADN de cualquier raza del patógeno presente en las mismas.

5

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método, basado en PCR convencional o cuantitativa en tiempo real (qPCR), fiable, rápido, exacto y reproducible para la  
10 detección y cuantificación de cualesquiera de las ocho razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6) en una muestra biológica aislada. Dicho método, de ahora en adelante “método de la invención”, permite la detección y cuantificación de, como mínimo, aunque sin limitarnos, 1 pg de ADN del patógeno en muestras biológicas complejas  
15 incluyendo, pero sin limitarnos, diferentes tejidos de la planta de garbanzo y suelos infestados, sin que su exactitud y eficacia se vea alterada.

La información obtenida mediante el método de la invención no solo es de utilidad para la identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en plantas o  
20 en suelos infestados por sus razas patogénicas, sino que además, ya que la cantidad de ADN del patógeno en las plantas al inicio del desarrollo de los síntomas de Fusariosis Vascular se encuentra correlacionada con la incidencia final de plantas muertas por la enfermedad, dicho método también es útil en la pronta predicción de resistencia/susceptibilidad de cultivares de garbanzo a  
25 razas específicas de este hongo, así como en la evaluación del riesgo de los cultivos de garbanzo de sufrir Fusariosis Vascular mediante el análisis del suelo en el que se encuentran y en la selección de suelos agrícolas libres de la presencia del patógeno o con niveles de inóculo mínimos de éste.

30 Así, un aspecto de la invención se refiere a un método de detección y cuantificación de cualesquiera de las razas patogénicas del hongo *Fusarium*

*oxysporum* f. sp. *ciceris* en una muestra biológica aislada, o método de la invención o protocolo de la invención, que comprende:

- a. extraer el ADN de una muestra biológica aislada,
- 5 b. poner en contacto el ADN extraído en el paso (a) con una mezcla de reacción que comprende una pareja de cebadores capaz de amplificar la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2,
- c. amplificar la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, y
- 10 d. detectar y/o cuantificar el producto de amplificación obtenido en el paso (c).

El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, pertenece a la división *Ascomycota*, clase *Sordariomycetes*, subclase *Hipocreomicetidae*, orden *Hipocreales*, grupo *Hipocreales* mitospóricos, género *Fusarium*, especie *Fusarium oxysporum*. Es  
15 el agente patógeno causante de la Fusariosis Vascular del garbanzo y presenta una elevada diversidad, habiéndose descrito ocho razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: 0, 1A, 1 B/C, 2, 3, 4, 5 y 6.

El término “muestra biológica aislada”, tal y como se utiliza en la descripción, se  
20 refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de una planta así como a muestras procedentes de suelo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica puede ser un tejido procedente de, por ejemplo aunque sin limitarnos, tallo o raíz de una planta de garbanzo, o puede ser un fluido biológico  
25 procedente de dicha planta, y además puede ser una muestra fresca o congelada. Por ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada del paso (a) procede de suelo o de una planta de garbanzo. En una realización más preferida, la muestra biológica aislada procedente de una planta de garbanzo procede de la raíz o el tallo.

30

Se entiende por “garbanzo”, “chícharo” o “*Cicer arietinum* L.”, la leguminosa de la familia de las Fabáceas, muy extendida, por ejemplo, en la India y en el

ámbito mediterráneo. Se trata de una planta herbácea, con flores blancas, lila pálido o morado (en función de la variedad) que desarrollan una vaina en cuyo interior se encuentran las semillas, generalmente una. El garbanzo es una planta anual diploide, su reproducción es por autogamia y posee un número cromosómico de  $2n=16$ . Las raíces profundizan en el suelo de manera considerable, de ahí que se desarrolle bien en condiciones de clima semi-árido o en suelos áridos o secos.

La extracción del ADN de una muestra biológica aislada puede llevarse a cabo mediante protocolos conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante *QIAmp DNA kit, Qiagen, Hilden, Alemania; DNA isolation Kit, G-Spin™ IIp Plant Genomic DNA extraction kit, Fast-Prep FP-120, MoBio Ultraclean™ soil DNA isolation, etc.*

Una vez extraído, el ADN de la muestra biológica aislada se pone en contacto con una mezcla de reacción para la amplificación enzimática del ADN, que comprende, además de unos cebadores capaces de amplificar la SEQ ID NO: 1 o unos cebadores capaces de amplificar la SEQ ID NO: 2, los reactivos necesarios para la realización de una PCR convencional o cuantitativa en tiempo real, por ejemplo, aunque sin limitarnos, agua ultrapura, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un tampón adecuado para la reacción de amplificación enzimática, una ADN polimerasa termoestable, una sal magnésica, etc. y en el caso de la PCR cuantitativa en tiempo real, además, uno o varios fluorocromos o sondas. Las sondas comúnmente empleadas para la PCR en tiempo real son, aunque sin limitarnos a ellas, sondas *TaqMan, Molecular Beacons* o sondas *Scorpion*.

Para la amplificación de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 se pueden diseñar, mediante métodos bien conocidos por expertos en la materia, numerosos cebadores complementarios a los extremos 5' y 3' de dichas secuencias nucleotídicas. Así, dichos cebadores se pueden diseñar, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante el software Bionumerics 6.0 (Applied

Maths, Bélgica). Sin embargo, cuando se diseñan cebadores es necesario hacer una serie de predicciones, como la temperatura de fusión ( $T_m$ ), la presencia de pares indeseables (a) o la posibilidad de formación de horquillas (b) que puedan reducir, por competencia, la efectividad de emparejamiento con la secuencia de ADN diana. Así pues, en otra realización preferida los  
5    cebadores del paso (b) del método de la invención capaces de amplificar la SEQ ID NO: 1 son los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. En otra realización preferida, los cebadores del paso (b) del método de la invención capaces de amplificar la SEQ ID NO: 2 son los  
10   cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

La amplificación enzimática de la SEQ ID NO: 1 o de la SEQ ID NO: 2 se puede llevar a cabo mediante el empleo de técnicas convencionales, preferiblemente mediante PCR convencional o cuantitativa en tiempo real  
15   (qPCR), bajo condiciones en las que estas secuencias amplificables, que pueden estar o no presentes en el ADN extraído en el paso (a) del método de la invención, son amplificadas para generar los productos de amplificación correspondientes. Así, en otra realización preferida, la amplificación del paso (c) del método de la invención se lleva a cabo mediante PCR cuantitativa en  
20   tiempo real o qPCR.

Para la detección del producto de amplificación enzimática obtenido en el paso (c) del método de la invención, éste se puede separar y analizar mediante cualquier método convencional que sirva para tal fin. En otra realización  
25   preferida, el producto de amplificación enzimática obtenido en el paso (c) se separa mediante electroforesis en gel de agarosa, acrilamida o, en general, en cualquier matriz a la que pueda aplicarse una corriente eléctrica que permita la separación de moléculas; y se visualiza por métodos convencionales, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante luz ultravioleta tras tinción con  
30   bromuro de etidio.

Para la cuantificación del producto de amplificación enzimática obtenido en el paso "c" del método de la invención, es necesario que el paso previo de amplificación se realice por PCR cuantitativa, también denominada qPCR, Q-PCR o PCR en tiempo real, la cual es una variante de la PCR utilizada para  
5 amplificar y, simultáneamente, cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación. Para ello emplea en la mezcla de reacción los mismos componentes que la PCR convencional, y además una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita  
10 medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se puede realizar después de cada ciclo de amplificación. La cuantificación puede realizarse en términos absolutos o relativos. En el primer caso, la estrategia es relacionar la señal de amplificación obtenida con el contenido en ADN empleando una curva de calibrado; para este enfoque es  
15 crucial que la PCR de la muestra y de los elementos de la recta de calibrado posean una misma eficiencia de amplificación. La cuantificación relativa es más fácil de realizar, puesto que no requiere curva de calibrado, y se sustenta en la comparación entre la cantidad amplificada de la secuencia de interés versus un gen o secuencia nucleotídica control (también llamada de referencia, interna o  
20 normalizador o *housekeeping gene*).

Por tanto, a diferencia de la PCR convencional, la PCR cuantitativa en tiempo real permite cuantificar el nivel de producto de amplificación obtenido en cualquier momento de la amplificación mediante la señal de fluorescencia (en  
25 realidad, mediante su nivel sobre un umbral). Los valores de fluorescencia, expresados como logaritmos a fin de estudiar fácilmente la fase exponencial de amplificación, que aparece como una línea recta al representar gráficamente el logaritmo de la fluorescencia frente al número de ciclo; este segmento, denominado segmento cuantificable, permite valorar la cantidad de ADN inicial.

30

En otra realización preferida, las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* que el método de la invención permite detectar y

cuantificar en una muestra biológica aislada, se seleccionan de la lista que comprende: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6.

5 Como se puede observar en los ejemplos, el método de la invención permite distinguir claramente reacciones susceptibles y resistentes en cultivares de garbanzo a razas del patógeno en fases muy tempranas después de la infección (por ejemplo, aunque sin limitarnos, 15 días después de la siembra), así como diferencias en la virulencia de las razas del patógeno. Los ejemplos también muestran que el método de la invención permite identificar, antes de  
10 que la expresión de los síntomas de enfermedad sea evidente, resistencia/susceptibilidad en los cultivares de garbanzo infectados en función de la cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* presente en la raíz de la planta. Además, el nivel de susceptibilidad a la Fusariosis Vascular, indicado por la incidencia de plantas muertas al final de la estación de crecimiento, se  
15 encuentra correlacionado alta, positiva y significativamente con la cantidad de ADN del patógeno cuantificado en la raíz de garbanzo. Así, el método de la invención ha demostrado ser una técnica rápida, eficaz y rentable para la cuantificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en tejidos de garbanzo asintomáticos o en las fases tempranas del proceso de infección, siendo por  
20 tanto de utilidad para los mejoradores tanto en cámara de crecimiento e invernadero como en campo. Además, la capacidad del método de la invención de detectar y cuantificar el patógeno tanto en el suelo como en la planta facilitará un mejor conocimiento y comprensión de la biología del patógeno y la epidemiología de la enfermedad y ayudará en su control.

25

Otro aspecto de la invención se refiere a los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, de ahora en adelante “primera pareja de cebadores de la invención” o “FOCP1”.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, de ahora en adelante “segunda pareja de cebadores de la invención” o “FOCP2”.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la primera o de la segunda pareja de cebadores de la invención para la detección de cualesquiera de las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. En una realización preferida de este aspecto de la invención, las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* se seleccionan de la lista que comprende: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la primera o de la segunda pareja de cebadores de la invención para la cuantificación de cualesquiera de las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. En una realización preferida de este aspecto de la invención, las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* se seleccionan de la lista que comprende: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de detección y cuantificación de cualesquiera de las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, de ahora en adelante "kit de la invención", que comprende una pareja de cebadores capaz de amplificar la SEQ ID NO: 1 y/o una pareja de cebadores capaz de amplificar la SEQ ID NO: 2. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la pareja de cebadores capaz de amplificar la SEQ ID NO: 1 es la primera pareja de cebadores de la invención. En una realización más preferida, la pareja de cebadores capaz de amplificar la SEQ ID NO: 2 es la segunda pareja de cebadores de la invención. Así, en una realización aun más preferida, el kit de la invención comprende la primera y/o la segunda pareja de cebadores de la invención.

En general, el kit de la invención comprende todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención como se ha descrito anteriormente. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, enzimas, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, dNTPs, una sal magnésica, sondas, fluorocromos, agentes para prevenir la contaminación, etc.

El kit puede contener además otras moléculas, genes, proteínas o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos; así como otra/s pareja/s de cebadores para la amplificación de una o varias secuencias nucleotídicas control. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para la detección y cuantificación de cualesquiera de las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. En una realización preferida de este aspecto de la invención, las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* se seleccionan de la lista que comprende: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1. Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación de la PCR usando las parejas de cebadores (A) FOCP3 o (B) FOCP4, condiciones de reacción M1 y ADN genómico de aislados tipo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.** M, Marcador de peso molecular Generuler™ DNA ladder mix (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). Carriles 1 a 4 y 6 a 9, aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-7802 y Foc-9605 (Raza 0), Foc-8012 y Foc-USA W6-1 (Raza 5), respectivamente; carriles 5 y 10 control negativo (agua).

**Fig. 2. Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación de la PCR usando la pareja de cebadores FOCP4, condiciones de reacción M1 y ADN genómico de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y *Fusarium oxysporum*.** M, Marcador de peso molecular Gene-ruler™ DNA ladder mix (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). Carriles 1 a 10, aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-7802 y Foc-9605 (Raza 0), Foc-1987-W17 y Foc-9602 (Raza 1B/C), Foc-9166 (Raza 1A), Foc-1992 R2N (Raza 2), Foc-1992 R3N (Raza 3), Foc-1992 R4N (Raza 4), Foc-8508 (Raza 5) y Foc-9170 (Raza 6), respectivamente; carril 11 aislado *F. oxysporum* Fo-90105; carril 12 control negativo (agua).

**Fig. 3. Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación de la PCR usando la pareja de cebadores FOCP4, condiciones de reacción M2 y ADN genómico de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y *Fusarium oxysporum*.** M, Marcador de peso molecular Gene-ruler™ DNA ladder mix (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). Carriles 1 a 10, aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-7802 y Foc-9605 (Raza 0), Foc-1987-W17 y Foc-9602 (Raza 1B/C), Foc-9166 (Raza 1A), Foc-1992 R2N (Raza 2), Foc-1992 R3N (Raza 3), Foc-1992 R4N (Raza 4), Foc-8508 (Raza 5) y Foc-9170 (Raza 6), respectivamente; carril 11 aislado *F. oxysporum* Fo-90105; carril 12 control negativo (agua).

**Fig. 4. Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación de la PCR usando la pareja de cebadores FOCP4, condiciones de reacción M1 y ADN genómico de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y *Fusarium oxysporum*.** M, Marcador de peso molecular Gene-ruler™ DNA ladder mix (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). Carriles 1 a 10, aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-7802 y Foc-9605 (Raza 0), Foc-1987-W17 y Foc-9602 (Raza 1B/C), Foc-9166 (Raza 1A), Foc-1992 R2N (Raza 2), Foc-1992 R3N (Raza 3), Foc-1992 R4N (Raza 4), Foc-8508 (Raza 5) y Foc-9170 (Raza 6), respectivamente; carril 11 aislado *F. oxysporum* Fo-90105; carril 12 control negativo (agua).

**Fig. 5. Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación de la PCR usando la pareja de cebadores FOCP4, condiciones de reacción M1 y ADN genómico de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y *Fusarium oxysporum*.** M, Marcador de peso molecular Gene-ruler™ DNA ladder mix (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). Carriles 1 a 10, aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-7802 y Foc-9605 (Raza 0), Foc-1987-W17 y Foc-9602 (Raza 1B/C), Foc-9166 (Raza 1A), Foc-1992 R2N (Raza 2), Foc-1992 R3N (Raza 3), Foc-1992 R4N (Raza 4), Foc-8508 (Raza 5) y Foc-9170 (Raza 6), respectivamente; carril 11 aislado *F. oxysporum* Fo-90105; carril 12 control negativo (agua).

**Fig. 6. Geles de agarosa mostrando los productos de amplificación de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando las parejas de cebadores (A) FOCP1 o (B) FOCP2 y ADN genómico de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.** M, Marcador de peso molecular Gene-ruler™ DNA (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). Carriles 1 a 11, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* aislados Foc-cc62R y Foc-9032 (Raza 0), Foc-cc-22D (Raza 1B/C), Foc-9166 y Foc-9027 PV1 (Raza 1A), Foc-8605 (Raza 2), Foc-8606 (Raza 3), Foc-8607 (Raza 4), Foc-8508 y Foc-USA 1-1 JG-62 (Raza 5), y Foc-8924 (Raza 6), respectivamente; carril 12, control negativo (ADN de garbanzo), y carril 13, control negativo (agua).

**Fig. 7. Gel de agarosa representativo mostrando los productos de amplificación de PCR utilizando la pareja de cebadores FOCP1.** M, Marcador de peso molecular Gene-ruler™ DNA (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania). Carriles 1 a 16, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* aislados Foc-7802 y Foc-9605 (Raza 0), Foc-1987-W-17 y Foc-9602 (Raza 1B/C), Foc-7989 y Foc-8272 (Raza 1A), Foc-1992 R2N y Foc-8605 (Raza 2), Foc-1992 R3N y Foc-8606 (Raza 3), Foc-1992 R4N y Foc-8607 (Raza 4), Foc-8012 y Foc-USA W6-1 (Raza 5), y Foc-8905 y Foc-KC1 (Raza 6), respectivamente; carril 17, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol-325-3, carril 18, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* Fom-9616, carril 19, *F. oxysporum* f. sp. *pisi* F-42, carril 20, *F. oxysporum* f. sp.

*niveum* Fon-8822, carril 21, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* Fop-DR85, carril 22, *F. oxysporum* Fo-90101, carril 23, *F. culmorum* 11427, carril 24, *F. nisikadoi* 10758.

5 **Fig. 8. Rectas de regresión lineal estándar de una dilución en serie 10x de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc-9605) (10 ng/μl) diluido en agua ultrapura estéril o en ADN (10 ng) extraído a partir de fragmentos de tallo o raíz de garbanzo o de suelo (10 ng).** Los valores de ciclo umbral (C<sub>T</sub>) se representan frente al logaritmo de ADN genómico de las curvas estándar de  
10 concentración conocida.

**Fig. 9. Reacción de enfermedad (valores medios ± desviación estándar) de los cultivares JG-62 y P-2245 creciendo en un suelo infestado artificialmente con las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*,**  
15 **difiriendo en su nivel de resistencia a cada raza (R: Resistente; S: Susceptible) a los 15 días después de la siembra bajo condiciones de ambiente controladas.** La cantidad de ADN del patógeno en la raíz (**A**) o el tallo (**B**) se estimó mediante el protocolo de qPCR específica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de la invención. (**C**) Valor de severidad de la reacción de  
20 enfermedad (escala 0-4). Los valores de porcentaje corresponden al número de muestras que fueron amplificadas mediante el protocolo de qPCR (**A y B**) o a la incidencia de plantas mostrando síntomas de Fusariosis Vascular (**C**). Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre la cantidad de cada raza detectada en el mismo cultivar; y el asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre cultivares para la misma raza del patógeno.  
25

**Fig. 10. Cantidad de ADN del patógeno (valores medios ± desviación estándar) en la raíz de 12 cultivares de garbanzo estimada mediante el protocolo de qPCR específica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de la invención a los 35 días después de la siembra (DDS) en una parcela de un campo infestada con las razas 0, 5 y 6 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.** La  
30 reacción de enfermedad de cada cultivar a las razas 0, 5 y 6 (R: Resistente; M:

Moderadamente susceptible; S: Susceptible); la incidencia final de enfermedad (%) estimada como el porcentaje de plantas muertas a los 85 DDS; el porcentaje de muestras amplificadas mediante el protocolo de qPCR de la invención y los valores de ciclo umbral ( $C_T$ ) se indican para cada cultivar.

5 Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* detectada mediante el protocolo qPCR de la invención. DL= Límite de detección ( $C_T \geq 35$ ).

10 **Fig. 11. Concentraciones de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* estimadas mediante el protocolo de qPCR específica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de la invención comparadas con el número de unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo de suelo presentes en un suelo artificialmente infestado (AIS) o en un suelo naturalmente infestado (Campus de Rabanales).**

15

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del método de la invención para la detección y cuantificación de cualesquiera de las ocho razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, así como la especificidad y efectividad de los cebadores de la invención para llevar a cabo dicho método. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines  
20 ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la  
25 invención que aquí se reivindica.

30

### **EJEMPLO 1. Diseño del método de la invención basado en PCR específica para la detección y cuantificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.**

1.1. Aislados del patógeno y condiciones de cultivo.

Se utilizó una colección de 115 aislados de *Fusarium* spp., de los cuáles 50 eran representativos de *F. oxysporum* ff. spp.: *ciceris* (42), *lycopersici* (uno), *melonis* (uno), *niveum* (uno), *phaseoli* (uno) y *pisi* (cuatro), y seis aislados no patogénicos de *F. oxysporum*. Los 59 aislados de *Fusarium* spp. restantes se  
5 obtuvieron de la colección de extipos de *Fusarium* spp. del Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Kansas, Manhattan, Kansas, EEUU. Estos últimos aislados eran representativos de las secciones de *Fusarium*, *Discolor*, *Elegans*, *Gibbosum*, *Lateritium*, *Liseola*, *Martiella*, *Roseum*, *Spicarioides* y *Sporotrichiella*.

10

Los 42 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* procedían de diversos orígenes geográficos y eran representativos de las ocho razas del patógeno descritas hasta la fecha; y los 6 aislados no patogénicos de *F. oxysporum* se obtuvieron de raíces de plantas sanas de garbanzo. Todos los aislados se conservaron en  
15 tubos conteniendo suelo estéril a 4 °C y en glicerol estéril al 35% a -80 °C para su almacenaje a largo plazo.

Los cultivos activos de los aislados se obtuvieron colocando pequeñas alícuotas de suelo conteniendo a los aislados en placas de Petri con agar patata dextrosa (APD) (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EEUU) e  
20 incubándolas durante 4 días a 25 °C y un fotoperíodo de 12-h de luz fluorescente y cercana al UV con una intensidad de 360  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para la extracción de ADN del hongo, se colocó un pequeño trozo de los cultivos activos de los aislados de *Fusarium* spp. sobre una película estéril de celofán  
25 extendida sobre una placa de APD e incubada durante 5-7 días como se describió anteriormente. Posteriormente, el micelio crecido sobre la superficie de celofán se raspó directamente con un escalpelo estéril, se liofilizó y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### 1.2. Material vegetal de garbanzo.

Se utilizaron los cultivares de garbanzo 12071/10054 (PV-1), PV-60, BG-212,  
5 P-2245, ICCV-2, UC-15, JG-62, CA334.20.4, ICC14216, PV61, WR-315 y CPS-  
1. Estos cultivares muestran una reacción de resistencia diferencial a la  
infección por las distintas razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. En cada  
experimento se utilizaron diferentes cultivares y tejidos de garbanzo: i) para  
10 optimizar el nuevo protocolo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)  
desarrollado, el ADN de la planta se extrajo de fragmentos de tallo y raíz  
muestreados de plantas de 'PV60' tras 30 días de crecimiento en arena estéril  
en una cámara de crecimiento ajustada a una temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  y a una  
humedad relativa del 60 al 90% con un fotoperíodo de 14-h de luz fluorescente  
a una intensidad de  $360 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Los tejidos muestreados se lavaron bajo  
15 agua del grifo, se desinfectaron superficialmente con NaOCl al 0,5% durante  
1,5 min, se secaron entre láminas de papel de filtro estériles, se liofilizaron, se  
molieron y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. ii) Para la evaluación de  
resistencia utilizando el protocolo qPCR, el ADN genómico total se extrajo  
directamente de tejidos de raíz y tallo congelados de cultivares 'P-2245' y 'JG-  
20 62' (véase en el ejemplo 2). iii) Para el experimento en campo, se usaron los 12  
cultivares de garbanzo referidos anteriormente y el ADN se extrajo de tejido  
radical liofilizado y molido (véase en el ejemplo 2).

### 1.3. Extracción y cuantificación de ADN, y desarrollo de curvas estándar de 25 ADN.

El ADN se extrajo de 50 mg de tejido vegetal liofilizado o de 100 mg de tejido  
fresco (según el experimento), o de 50 mg de micelio del patógeno liofilizado,  
usando el kit G-Spin™ IIp Plant Genomic DNA extraction (Intron  
30 Biotechnology, Corea) y el sistema Fast-Prep FP-120 (MP biomedical, Illkirch,  
Francia). El ADN se extrajo de muestras de suelo de 250 mg usando el sistema  
FP-120 funcionando a 5,0 m/s durante 40 s combinado con el uso del kit MoBio

Ultraclean™ soil DNA isolation (MoBio laboratories, Inc; Carlsbad, CA, EEUU) según las instrucciones del fabricante.

La calidad del ADN se valoró mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Todas las muestras de ADN se cuantificaron mediante el kit  
5 Quant-iT DNA Assay Kit Broad Range fluorometric (Molecular Probes Inc., Leiden, Países Bajos) y un fluoroespectrómetro Tecan Safire (Tecan España, Barcelona, España). Se aseguró obtener concentraciones exactas de ADN del huésped y el patógeno cuantificando cada muestra por triplicado y en dos  
10 microplacas independientes. Como control interno de cuantificación de ADN, se incluyeron en cada placa de cuantificación muestras de ADN de concentración conocida. El ADN se diluyó con agua ultrapura estéril (SUW) para obtener una concentración de ADN total que varió de 0 a 10 ng/μl.

Las curvas estándar de ADN para los ensayos de qPCR se obtuvieron de diluciones seriadas 10X de ADN del aislado de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-9605. Para este propósito, el ADN del aislado (10 ng/μl) se diluyó de forma seriada (1:1, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup> y 1:10<sup>5</sup>) en SUW (W/Foc-9605), así como en un fondo fijo de ADN de la planta (10 ng/μl) extraído de tallos (CS/Foc-9605)  
20 y raíces (CR/Foc-9605) del cultivar 'PV-60' o de una mezcla de suelo artificial (SM/Foc-9605). Previamente se comprobó que la mezcla de suelo artificial no contenía ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* por medio de un ensayo de PCR específica. Cada curva estándar siempre incluía ADN de la planta o suelo sólo y/o ausencia de ADN como controles negativos. Se obtuvieron dos curvas  
25 estándar de ADN independientes utilizando ADN de la planta, suelo y patógeno.

#### 1.4. Diseño de cebadores y desarrollo del protocolo de PCR específica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

30

Inicialmente se desarrollaron 4 parejas de cebadores (Tabla 1), y se probó, de manera independiente, su eficiencia y reproducibilidad bajo diferentes

condiciones de reacción (Tabla 2) en las que variaban parámetros como la temperatura de hibridación y las concentraciones de los cebadores y de  $MgCl_2$ , las cuáles se ajustaron experimentalmente para optimizar la amplificación, con cada pareja de cebadores, de diferentes aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*  
5 tipo indicados en las figuras.

Las parejas de cebadores diseñadas amplificaban específicamente porciones internas de una secuencia específica SCAR de 1,5 kb de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (número de acceso en el GenBank: AF492451). Los cebadores se  
10 diseñaron con el software Bionumerics 6.0 (Applied Maths, Bélgica). Se llevó a cabo un test 'in silico' de especificidad de cebadores cotejando las secuencias de los mismos frente a la base de datos del GenBank no redundante con parámetros establecidos para la identificación de 'emparejamientos cortos casi exactos' (short, nearly exact matches), verificando así la ausencia de  
15 homología con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank.

Se evaluaron diferentes parámetros en el protocolo de PCR para optimizar las condiciones de amplificación. Así, las condiciones de reacción tales como la temperatura de hibridación y las concentraciones de los cebadores y de  $MgCl_2$   
20 se ajustaron experimentalmente para optimizar la amplificación con cada pareja de cebadores. Todas las condiciones se repitieron al menos dos veces y siempre se incluían controles positivos (ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-9605) y negativos (por ejemplo, ADN de otras *Fusarium* spp., *F. oxysporum* no patogénicos u otras ff. spp. de *F. oxysporum* y ausencia de ADN). Los  
25 productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón 1× TAE durante 60-120 min a 80 V, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV. Para la electroforesis se usó el marcador de peso molecular Gene-ruler™ DNA ladder mix (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania).

Pareja	Nombre	Sentido	Secuencia (5'-3')
FOCP1	SEQ ID NO: 3	Directo	TACGGTACCAGATCATGGCGT
	SEQ ID NO: 4	Inverso	CGCTTTTCGATCGTGGCTATG
FOCP2	SEQ ID NO: 5	Directo	CATGGTTTTCGTTAGGCCAGT
	SEQ ID NO: 6	Inverso	CGCAGTCTTCGTTCGTCATTA
FOCP3	SEQ ID NO: 7	Directo	GCTACTATCAGCATAACAAACG
	SEQ ID NO: 8	Inverso	GTCCTTCACACCATCATCC
FOCP4	SEQ ID NO: 9	Directo	AAACCAAGCAGTGTGAATACC
	SEQ ID NO: 10	Inverso	CTCTCCTAGCCTCCAAGTCC

**Tabla 1.** Cebadores diseñados inicialmente para el método de la invención basado en PCR y su secuencia.

- 5 Las dos parejas de cebadores FOCP3 y FOCP4 se probaron con dos mezclas de reacción (M1 y M2, Tabla 2) y con ADN genómico de aislados tipo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Componentes	M1 1 x	Final	M2 1 x	Final
10 x Buffer	2,00	1 x	2,00	1 x
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,60	1,5 mM	0,60	1,5 mM
dNTPs (5 mM cada uno)	0,80	200 µM	0,4	100 µM
ddH <sub>2</sub> O	14,80		15,20	
FOCP3 Directo ó FOCP4 Directo (25 pmol/µl)	0,30	0,35 µM	0,30	0,35 µM
FOCP3 Inverso ó FOCP4 Inverso (25 pmol/µl)	0,30	0,35 µM	0,30	0,35 µM
Taq	0,20	1 U/20 µl	0,20	1 U/20 µl
ADN	1,00		1,00	
Volumen final	20,00		20,00	

**Tabla 2.** Mezclas de reacción iniciales utilizadas en la puesta a punto de la PCR con las parejas de cebadores FOCP3 y FOCP4.

10

Los resultados de los geles de agarosa no mostraron amplificación de ninguno de los aislados utilizados bajo ninguna de las condiciones de reacción utilizadas para la pareja de cebadores FOCP3 (Fig. 1A) por lo que se descartó

su uso. En cambio la pareja de cebadores FOCP4 (Fig. 1B) proporcionaba productos de amplificación moderados para la breve selección de aislados tipo ensayada, por lo que se decidió continuar con su optimización incluyendo más aislados representativos de las otras razas del patógeno, utilizando tanto las  
5 condiciones de reacción M1 como las M2 (Tabla 2), puesto que ambas habían mostrado productos de amplificación de intensidad similar. En este caso los resultados mostraron que no todos los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* amplificaron y presentaban además muy diferente intensidad de señal cuando los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en  
10 geles de agarosa (Fig. 2 y 3).

Debido a ello, se decidió experimentar con otras condiciones de amplificación y mezclas de reacción más permisivas con la amplificación incrementando la cantidad de cebadores hasta una concentración final de 0,5  $\mu$ M y reduciendo la  
15 temperatura de anillamiento en 7°C en primer lugar y en 5°C en una segunda prueba experimental (Fig. 4 y 5, respectivamente). No obstante, los resultados mostraron que ninguna de las condiciones experimentales optimizaba la amplificación del fragmento de ADN deseado, por lo que también se descartó esta pareja de cebadores.

20

A la vista de estos resultados, se ensayaron a continuación las otras dos parejas de cebadores diseñadas. En la Tabla 3 se presenta la denominación de estas dos parejas de cebadores de la invención, FOCP1 y FOCP2, y el tamaño de los productos de PCR que amplifican con las condiciones de amplificación  
25 optimizadas.

Pareja	Nombre	Sentido	Temperatura de fusión (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
FOCP1	SEQ ID NO: 3	Directo	71	160
	SEQ ID NO: 4	Inverso	70	
FOCP2	SEQ ID NO: 5	Directo	68	158
	SEQ ID NO: 6	Inverso	68	

**Tabla 3.** Parejas de cebadores de la invención seleccionadas finalmente para la PCR.

5 Las parejas de cebadores FOCP1 y FOCP2 fueron adecuadas para la identificación específica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. La mezcla de reacción optimizada fue similar para ambas parejas de cebadores, y para un volumen final de 20 µl, consistió en 2,0 µl de 10× tampón de reacción [160mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C), 0,1% estabilizador], 0,35 µM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP, 1 unidad de *BioTaq* ADN Polimerasa  
10 (Bioline, Londres, Reino Unido), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, y 1 µl de ADN molde (20 a 40 ng de ADN). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador C1000 (Bio-Rad) con las condiciones de amplificación: desnaturalización durante 1 min a 94°C, seguido de 25 ciclos de 30 s de  
15 desnaturalización a 94°C, 30 s a una temperatura de hibridación de 55°C y 30 s de extensión a 72°C. El ciclo final consistió en 5 min a 72°C seguido de enfriamiento a 4°C.

En ensayos de PCR simple utilizando las parejas de cebadores FOCP1 y  
20 FOCP2 y ADN genómico de 42 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* representativos de las razas 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5, y 6, y de un amplio rango de origen geográfico, se amplificó sólo un producto de 160 y 158 pb, respectivamente (Fig. 6; Tabla 3). Ocasionalmente, se observaron algunos dímeros en la pareja de cebadores FOCP2 (Fig. 6). Ninguno de estos  
25 productos específicos se amplificó cuando se utilizó ADN de 7 aislados no patogénicos de *F. oxysporum*, de otras 8 ff. spp. de *F. oxysporum*, o de otras

59 especies de *Fusarium* spp. como ADN molde en los ensayos de PCR específica con las parejas de cebadores FOCP1 y FOCP2 (Fig. 7; sólo se presentan los resultados para el cebador FOCP1).

5 1.5. Optimización, reproducibilidad y sensibilidad del protocolo de qPCR desarrollado.

Para optimizar el protocolo de qPCR se ajustaron experimentalmente las condiciones de reacción para ambas parejas de cebadores FOCP1 y FOCP2  
10 (por ejemplo, volumen de reacción, temperatura de hibridación, concentración de cebadores, temperatura de medida de la señal de fluorescencia del amplicón, etc.). Todas las amplificaciones de qPCR se realizaron utilizando la mezcla de reacción iQ SYBR Green Supermix, placas de PCR iQ 96-thin well, y láminas de sellado óptico (Bio-Rad, Madrid, España), y el termociclador iCycler IQ (Bio-Rad). Después del ciclo de amplificación final, se obtuvo un perfil de la  
15 temperatura de la curva de 'melting' o fusión calentando hasta 95 °C, enfriando a 55 °C y calentando lentamente hasta 95 °C a intervalos de 0,5 °C cada 10 s con medida continua de fluorescencia a 520 nm. Todas las reacciones se analizaron mediante electroforesis en gel para confirmar que sólo se amplificó  
20 un producto de PCR de las muestras que contenían ADN genómico de aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y no se obtenía producto amplificado en los controles negativos.

Se valoró también la influencia potencial del ADN huésped y/o su procedencia  
25 (tejido de la planta: raíz frente a tallo) así como del ADN del suelo en la eficiencia de las amplificaciones de la qPCR en diferentes experimentos. Para ese propósito, se usó sólo la pareja de cebadores FOCP1. Para esos experimentos, las comparaciones de fondos de ADN se realizaron en la misma placa de PCR de 96 pocillos. Las amplificaciones de PCR cuantitativa de cada  
30 serie de curva estándar de ADN incluían tres repeticiones por tratamiento y placa. Todos los experimentos se repitieron dos veces independientemente (diferentes placas de PCR, operadores y curvas estándar de ADN) y siempre

incluían una curva estándar de ADN común para comparar la variabilidad entre, así como dentro, de los experimentos. Finalmente, la sensibilidad del protocolo de qPCR se determinó con dos series de tres curvas estándar de ADN (W/Foc-9605, CR/Foc-9605 y SM/Foc-9605) y se comparó con el protocolo de PCR simple usando los cebadores FOCP1.

Se llevó a cabo un proceso de ajuste preciso paso a paso para cada una de las parejas de cebadores FOCP1 y FOCP2 que incluyó los siguientes parámetros de PCR: concentración del cebador, temperatura de hibridación, y volumen final de las reacciones de PCR. Para ello, se utilizaron las curvas estándar de ADN W/Foc-9605, y CS/Foc-9605. La reducción del volumen estándar de la reacción de 50 a 20  $\mu$ l no modificó la precisión del ensayo; en consecuencia, se seleccionó un volumen final de 20  $\mu$ l para minimizar el coste por ensayo de qPCR.

La mezcla de reacción de PCR optimizada para un volumen final de 20  $\mu$ l consistió en: 1  $\mu$ l de ADN muestra, 1 $\times$  iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Madrid, España), y 0,3  $\mu$ M de cada cebador. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C de 1 min seguida por 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, y 30 s a 72 °C. La fluorescencia emitida por el amplicón diana se detectó a 72 °C. Ocasionalmente, se observaron pequeños picos entre 72-75 °C en la curva de temperatura de fusión, especialmente para la pareja de cebadores FOCP2. Este hecho fue debido a la presencia de dímeros de la pareja de cebadores, ya que estas amplificaciones inespecíficas no se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % (peso/vol). No se observó señal de fluorescencia en los controles negativos utilizando agua o muestras de ADN extraído de los diferentes órganos de plantas de garbanzo. Para todos los experimentos se fijó un valor umbral de 200 Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) para determinar los valores de  $C_T$ .

El uso de ambas parejas de cebadores produjo amplificaciones altamente reproducibles. Las rectas de regresión estándar obtenidas para la pareja de

cebadores FOCP1 indicaron una eficiencia de amplificación del 93,9-102,6% y un valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,991-0,999, y para la pareja de cebadores FOCP2 la eficiencia de amplificación fue del 81,7-104,9% y el valor del coeficiente de determinación fue 0,989-0,998. Se seleccionó la pareja  
5 de cebadores FOCP1 para los experimentos posteriores.

Tras la optimización del protocolo de qPCR, se generaron las rectas de regresión estándar para cada curva estándar de ADN utilizando un rango de ADN desde 10 ng a 0,1 pg. La utilización del protocolo de qPCR con curvas  
10 estándar de ADN construidas de forma independiente o por diferentes operadores, no influyó en la reproducibilidad y consistencia de los resultados. Se obtuvo una alta reproducibilidad en las amplificaciones con una alta eficiencia que se mantuvo por encima de cinco órdenes de magnitud en las diluciones de ADN y que mostró un rango lineal de amplificación. El ADN de *F.*  
15 *oxysporum* f. sp. *ciceris* no se cuantificó adecuadamente a una concentración de 0,1 pg, ya fuese en ADN diluido en agua o en ADN extraído de tejidos de tallo o raíz de plantas de garbanzo, o de suelo; es decir, valor  $C_T$  de  $34,5 \pm 2$  o ausencia de amplificación. En consecuencia, el límite de detección del protocolo de qPCR se fijó en una concentración de ADN de *F. oxysporum* de  
20 0,1 pg o un valor  $C_T$  de 35 ciclos.

El análisis de la varianza estándar (ANOVA) de los valores de  $C_T$  obtenidos para las diferentes curvas de ADN estándar W/Foc-9605, CR/Foc-9605, CS/Foc-9605 y SM/Foc-9605 indicó homogeneidad de las varianzas entre los  
25 diferentes tratamientos ( $P \geq 0,05$ ). El origen del fondo de ADN (agua vs. raíz o tallo o suelo) no modificó los resultados de los ensayos de qPCR (Fig. 8). Así, la comparación estadística de las estimaciones de los parámetros de las cuatro rectas de regresión lineal estándar indicó la ausencia de diferencias significativas entre las ordenadas en el origen ( $P = 0,0970$ ) o pendientes ( $P =$   
30  $0,2556$ ). Puesto que el uso de fondos de ADN de diferentes tejidos del huésped o suelo no influyó en la reproducibilidad y eficiencia de los protocolos, se seleccionó la curva de ADN estándar CR/Foc-9605 para estimar la cantidad de

biomasa de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en tejidos de la planta naturalmente infectados por el patógeno, y la curva de ADN estándar SM/Foc-9605 para estimar dicha biomasa en suelos natural o artificialmente infestados.

5 **EJEMPLO 2. Evaluación de la resistencia de la planta de garbanzo y de la virulencia de los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* por medio del método de la invención basado en qPCR.**

Se llevó a cabo un experimento para determinar la utilidad del protocolo de  
 10 qPCR desarrollado para evaluar la resistencia de cultivares de garbanzo a la Fusariosis Vascular. Se utilizaron los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-USA W6-1 (raza 5; altamente virulenta) y Foc-7802 (raza 0; menos virulenta). El inóculo de los aislados del patógeno para el experimento se incrementó en una mezcla de arena:harina de maíz:agua (AMA) previamente  
 15 descrita. La densidad de inóculo en la mezcla (número de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de AMA infestado) se determinó por el método de dilución en placa utilizando un medio semi-selectivo para *Fusarium* spp. (zumo V8-oxgall-pentacloronitrobenzeno agar; VOPA). Posteriormente, el AMA infestado se mezcló cuidadosamente con una mezcla de suelo  
 20 (limo/arena/turba, 1:1:1, v/v/v) esterilizada en autoclave (121 °C, durante 75 min, dos veces) en la proporción adecuada para obtener una densidad de inóculo de  $10^5$  ufc por gramo de suelo.

En este experimento se utilizaron los cultivares de garbanzo P-2245 y JG-62,  
 25 los cuáles muestran reacciones de resistencia diferencial bien caracterizadas a los aislados Foc-USA W6-1 y Foc-7802 (P-2245, susceptible a ambas razas; JG-62, resistente a raza Foc-7802 y susceptible a raza Foc-USA W6-1). Las semillas germinadas seleccionadas por su uniformidad (longitud de la radícula = 1 a 2 cm) se sembraron en macetas de arcilla de 15 cm de diámetro (una  
 30 planta por maceta), se rellenaron con la mezcla de suelo y se incubaron en una cámara de crecimiento visitable ajustada a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C y un fotoperíodo de 14-h de luz fluorescente a una intensidad de  $360 \mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

durante 5 semanas. Se dispusieron 14 plantas de garbanzo por combinación aislado-cultivar. Para cada combinación experimental, para la extracción de ADN se muestrearon seis plantas a los 15 días después de la siembra, y las ocho plantas restantes se utilizaron para valorar el desarrollo de la enfermedad hasta los 45 días después de la siembra, periodo de tiempo utilizado habitualmente para la evaluación de resistencia en garbanzo a la Fusariosis Vascolar. Las plantas se extrajeron de las macetas, se lavaron ligeramente bajo el agua del grifo, se desinfectaron en NaOCl 2% durante 1,5 min y se secaron entre láminas de papel de filtro estéril. Para cada planta muestreada, se congelaron el tallo y la raíz independientemente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. El ADN se extrajo de 100 mg de tejidos de la raíz o tallo principal congelados como se ha descrito anteriormente.

Se valoró la incidencia, *I*, (escala de 0 a 1) y la severidad de los síntomas foliares, *S*, (considerada en una escala de 0 a 4) de plantas individuales en intervalos de 2-3 días. Valores promedio de severidad <1 y >3 se consideraron reacciones resistentes y susceptibles, respectivamente, y valores de severidad comprendidos entre ellos ( $\geq 1$  y  $\leq 3$ ) se consideraron reacciones moderadamente susceptibles.

No se observaron síntomas de Fusariosis Vascolar en plantas de 'JG-62' resistente, ni 'P-2245' susceptible, cuando éstas fueron inoculadas con la raza 0, la menos virulenta de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, cuando éstas se muestrearon a los 15 días después de la siembra. Por el contrario, en ese mismo periodo, las plantas inoculadas con la raza 5, la más virulenta del patógeno, mostraron una incidencia de enfermedad en 'JG-62' y 'P-2245' del 33,3 y 54,3%, respectivamente. No obstante, el nivel de severidad de síntomas de la enfermedad alcanzado fue muy bajo ( $S < 0,5$ ) (Fig. 9C). Al final del experimento, 45 días después de la siembra, todas las plantas de las combinaciones compatibles (es decir, 'P-2245'/raza 0, 'P-2245'/raza 5 y 'JG-62'/raza 5) murieron consecuencia de la infección (es decir,  $S = 4$ ).

La utilización del protocolo de qPCR desarrollado permitió la detección de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en todas las muestras de raíz de todas las plantas y todas las combinaciones raza-cultivar a los 15 días después de la siembra. Sin embargo, las cantidades de ADN del patógeno estimadas en tejidos de raíz de plantas de la combinación más compatible (cultivar altamente susceptible/raza altamente virulenta; es decir, 'P-2245'/raza 5 y 'JG-62'/raza 5) fue significativamente ( $P = 0,0002$ ) superior comparada tanto con la estimada para la combinación incompatible resistente ('JG-62'/raza 0), como en la menos compatible ('P-2245'/raza 0). No se observaron diferencias significativas ( $P = 0,2017$ ) para la concentración de ADN del patógeno estimada en la raíz de los dos cultivares de garbanzo (Fig. 9A).

No se pudo detectar el patógeno en muestras de ADN extraído de tallos de garbanzo de la combinación incompatible, resistente 'JG-62'/raza 0, pero logró detectarse en el 33,3% de las muestras de tallo de plantas 'P-2245' inoculadas con la raza 0 (Fig. 9B). Sin embargo, se detectaron cantidades del patógeno significativamente ( $P = 0,0083$ ) mayores y en un mayor porcentaje de las muestras de tallos de la combinación más compatible (es decir, 'P-2245'/raza 5 y 'JG-62'/raza 5); siendo la cantidad detectada en el tallo para la raza 5 en 'P-2245' significativamente mayor ( $P=0,0006$ ) que la detectada en 'JG-62' (Fig. 9B).

También se validó el uso del protocolo de qPCR para cuantificar la biomasa de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en plantas de garbanzo creciendo en condiciones naturales. Para lograr ese objetivo, se extrajo ADN de raíces de cultivares de garbanzo PV-1, PV-60, BG-212, P-2245, ICCV-2, UC-15, JG-62, CA334.20.4, ICC14216, PV-61, WR-315 y CPS-1 que crecieron en una parcela localizada en la estación experimental del 'Campus de Rabanales', Universidad de Córdoba, España. El suelo de esta parcela (Vertisol, Haploxerets; 50% arcilla, 33% limo, 17% arena; pH 8,6, 1,4% materia orgánica) estaba infestado con una combinación de diferentes poblaciones de *F. oxysporum* incluyendo las razas 0, 5 y 6 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Se dispusieron 3 repeticiones (bloques)

con dos filas por bloque para cada cultivar; cada fila tuvo 40 m de largo y estaban separadas 25 cm. Las semillas se sembraron a mano a 5 cm de profundidad. Se eliminaron a mano las malas hierbas de la parcela, y los insecticidas y fertilizantes se aplicaron de acuerdo con las prácticas agrícolas habituales.

En el inicio de la fase de floración (aproximadamente 35 días después de la siembra), se extrajeron tres plantas sin síntomas de enfermedad seleccionadas arbitrariamente dentro de cada fila, se eliminó el exceso de suelo de las raíces agitando ligeramente la planta y el sistema radical completo de las seis plantas de cada bloque se unió como una muestra única, se trasladaron al laboratorio en una bolsa de plástico y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. El ADN se extrajo de 50 mg de raíces de garbanzo liofilizadas como se describió anteriormente. En este experimento, se utilizaron raíces liofilizadas en lugar de congeladas en fresco para incrementar la uniformidad de las muestras procesadas. No se encontraron diferencias significativas en el resultado de la amplificación de qPCR cuando el fondo de ADN de la planta extraído procedía de tejidos radicales frescos o liofilizados. Después del muestreo de plantas asintomáticas, se valoró la reacción de enfermedad de los 12 cultivares de garbanzo en la parcela, registrando para ello la incidencia de plantas con síntomas y muertas por Fusariosis Vascular a intervalos de 10-15 días durante el periodo completo de crecimiento.

La cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en muestras de raíz y tallo se estimó utilizando las condiciones de qPCR optimizadas y la curva estándar CR/Foc-9605 (diluciones seriadas de ADN de Foc-9605 en un fondo fijo de ADN de raíz de garbanzo de 10 ng) y seis repeticiones por planta. El ensayo de PCR se repitió dos veces para cada muestra.

La utilización del protocolo de qPCR desarrollado permitió la detección ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el 100% de las muestras de raíz de 'PV-61', 'P-2245', 'PV-1', 'JG-62', y 'PV-60', los seis cultivares de garbanzo sembrados en

la parcela experimental infestada utilizada en el estudio y que son susceptibles a algunas de las razas del patógeno (0, 5 y 6) que están presentes en este suelo. De forma similar, hubo una detección positiva en el 83,3% de muestras de raíz de 'ICCV-2', que es resistente a la raza 0 pero susceptible a las razas 5 y 6, y sólo una detección del 41,7% de las muestras de raíz de 'CPS-1', que es moderadamente susceptible a la raza 5 pero resistente a las razas 0 y 6 (Fig. 10). La cantidad relativa de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en muestras de raíz de cultivares de garbanzo susceptibles a las razas 0, 5 y 6 varió significativamente ( $P < 0,0001$ ) entre cultivares, oscilando entre 0,21% en el cultivar ICCV-2 al 10,21% en el cultivar P-2245 (Fig. 10). Por otro lado, los valores de incidencia final de plantas muertas por la enfermedad estuvo positiva y significativamente correlacionada ( $r = 0,8722$ ;  $P = 0,0235$ ) con la cantidad de ADN del patógeno estimada 35 días después de la siembra, antes del inicio del desarrollo de síntomas de Fusariosis Vascular (Fig. 10). Estos resultados demuestran la utilidad del protocolo de qPCR de la invención para la predicción de la reacción de resistencia/susceptibilidad de cultivares de garbanzo a la Fusariosis Vascular en condiciones de campo. Es de destacar además, que el patógeno pudo ser cuantificado en el 25 a 66,7% de las muestras del resto de cultivares de garbanzo en el experimento que fueron resistentes a las razas 0, 5 y 6 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* que infestan el suelo de la parcela (excepto para los cultivares BG-212 y WR-315), aunque en estos cultivares los valores de  $C_T$  fueron próximos a los establecidos como límite de detección  $C_T=35$  (es decir, 32,6-34,0) (Fig. 10).

### 25 **EJEMPLO 3. Cuantificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en suelo mediante el método de la invención basado en qPCR.**

Para llevar a cabo la inoculación artificial del suelo, el inóculo de los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-7802 y Foc-USA W6-1 se incrementó en 100 ml de caldo de patata dextrosa (Difco Laboratories). Los cultivos líquidos se filtraron a través de ocho capas de gasa estéril, se separaron las conidias mediante centrifugación (10.000 x *g* durante 10 min) y se lavaron dos veces

con agua destilada estéril para eliminar trazas de nutrientes. La concentración de inóculo (principalmente microconidias) en la suspensión se estimó usando un hematocitómetro y se ajustó a  $2 \times 10^4$  ufc/ml con SUW. Un suelo natural (Entisol, Xerofluvents; 27% arcilla, 9,3% limo y 63,8% arena; pH 7,4, 1,9% materia orgánica) en el que se comprobó la ausencia de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, se pasteurizó a 74 °C durante 30 min, se secó a temperatura ambiente (24 a 28 °C) durante una semana y se tamizó con una malla de 1x1 cm. Posteriormente, 10 ml de la suspensión de microconidias ( $2 \times 10^4$  ufc/ml) de cada aislado se mezcló minuciosamente con 100 g de suelo en una bolsa de plástico para obtener aproximadamente  $2 \times 10^3$  ufc/g. Finalmente el suelo infestado se secó a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C durante 5 meses antes de su utilización. Adicionalmente, se usó una muestra de suelo naturalmente infestado de la parcela localizada en el 'Campus de Rabanales'. El suelo se secó y se tamizó como se ha descrito anteriormente previamente a la extracción de ADN.

El número de propágulos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en las muestras de suelo natural y artificialmente infestadas se determinó al mismo tiempo que la extracción de ADN mediante dilución en placa usando seis repeticiones de 1 g cada una por tipo de suelo. Se inocularon diluciones seriadas de las suspensiones de suelo en placas de Petri con medio VOPA semi-selectivo para *Fusarium* spp. y se incubaron a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C con un fotoperíodo de 12 h de luz fluorescente y cercana a la UV con una intensidad de  $36 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  durante 5 días. Se realizaron dos repeticiones por dilución y tipo de suelo. A los 5 días de incubación se estimó el número total de ufc de *Fusarium* spp. (suelo natural) o *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (suelo artificialmente infestado). Posteriormente, de las diluciones se seleccionaron al azar aproximadamente el 10% de colonias procedentes de muestras de suelo naturalmente infestado con morfología similar a *F. oxysporum* bajo observación al microscopio y se transfirieron a APD. El ADN de los aislados putativos de *F. oxysporum* se obtuvo como se ha descrito anteriormente y se utilizó para

ensayos de PCR usando la pareja de cebadores FOCP1 específica para *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.

La cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en las muestras de suelo se estimó usando las condiciones de qPCR optimizadas y la curva estándar SM/Foc-9605 (diluciones seriadas de ADN de Foc-9605 en un fondo fijo de ADN de suelo de 10 ng). Se realizaron seis repeticiones de cada muestra por tipo de suelo y dos ensayos de PCR por muestra.

En cuanto al análisis de los datos, inicialmente los valores del ciclo umbral ( $C_T$ ) para cada reacción se calcularon determinando el número de ciclo de PCR al cuál la señal de fluorescencia excedía del valor umbral utilizando los criterios de estimación por defecto en el paquete iCycler IQ versión 3.0a (Bio-Rad). Posteriormente, para comparar y establecer relaciones entre las diferentes curvas estándar de ADN generadas en los distintos tratamientos, la posición umbral se definió manualmente y con el mismo valor para todos los tratamientos y experimentos. La eficiencia de amplificación (AE) se calculó a partir de las pendientes de las curvas estándar utilizando la ecuación  $AE = 10^{(1/\text{pendiente})} - 1$ .

Se realizaron regresiones lineales del logaritmo en base 10 de concentraciones conocidas de ADN diana frente a los valores  $C_T$  para cada curva estándar utilizando el módulo GLM de SAS (Statistical Analysis System, version 9.1; SAS Institute, Cary, NC, EEUU). Las rectas de regresión estándar estimadas en cada placa a partir de las curvas de ADN de referencia se utilizaron para transformar los valores  $C_T$  experimentales en cantidades de ADN patógeno (ng). Todas las rectas de regresión obtenidas para los diferentes fondos de ADN de la planta se compararon estadísticamente para la homogeneidad ( $P \geq 0,05$ ) de varianza (Test de Bartlett) y para la igualdad de pendientes y ordenadas en el origen mediante el Test  $F$  a una  $P < 0,05$ .

Los datos de población de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se convirtieron a log (ufc/g) de peso fresco de raíz para satisfacer las condiciones del test estadístico paramétrico utilizado. Las diferencias en la concentración de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* entre los cultivares de garbanzo y las razas del patógeno se determinó mediante un análisis de varianza estándar y las medias de cada tratamiento se compararon de acuerdo al test de mínimas diferencias significativas protegido de Fisher a  $P < 0,05$  utilizando el módulo GLM de SAS. Finalmente, se llevaron a cabo análisis de regresión lineal para determinar la relación entre la concentración de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en las raíces de los diferentes cultivares de garbanzo y la incidencia de enfermedad final mediante el módulo GLM de SAS.

La siembra de una dilución de suelo artificialmente infestado con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* Foc-7802 y Foc-USA W6-1 sobre medio VOPA indicó una densidad media de población de  $4,96 \times 10^3$  y  $2,98 \times 10^3$  ufc/g de suelo, respectivamente. Las densidades de poblaciones indígenas de *Fusarium* spp. y de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el suelo naturalmente infestado procedente del 'Campus de Rabanales' promediaron  $8,92 \times 10^2$  y 44,5 ufc/g de suelo, respectivamente (Fig. 11). Las colonias de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* representaron menos del 5% del total de colonias de *Fusarium* spp. en esta parcela. Este nivel de población fue menor y mostró una mayor variabilidad entre repeticiones en comparación con la observada en suelos artificialmente infestados.

La utilización del protocolo de qPCR permitió la detección de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el 100% de las muestras (seis extracciones de ADN independientes) tomadas del suelo artificialmente infestado, alcanzando  $692,6 \pm 149,4$  y  $10,7 \pm 5,6$  pg ADN/g de suelo seco para Foc-7802 y Foc-USA W6-1, respectivamente (Fig. 11). Por el contrario, se pudo cuantificar ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el 66,7% de muestras procedentes de seis extracciones de ADN independientes del suelo naturalmente infestado 'Campus

de Rabanales'. La cantidad de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el suelo fue variable, y osciló entre 2,7 hasta 9,4 pg ADN/g de suelo (Fig. 11).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método de detección y cuantificación de cualesquiera de las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en una muestra biológica aislada que comprende:
- 10 a. extraer el ADN de una muestra biológica aislada,  
b. poner en contacto el ADN extraído en el paso (a) con una mezcla de reacción que comprende una pareja de cebadores capaz de amplificar la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2,  
c. amplificar la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, y  
d. detectar y/o cuantificar el producto de amplificación obtenido en el paso (c).
- 15 2. Método según la reivindicación 1 donde la muestra biológica aislada del paso (a) procede de suelo o de una planta de garbanzo.
3. Método según la reivindicación 2 donde la muestra biológica aislada procedente de una planta de garbanzo procede de raíz o tallo.
- 20 4. Método según cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde los cebadores del paso (b) capaces de amplificar la SEQ ID NO: 1 son los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
- 25 5. Método según cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde los cebadores del paso (b) capaces de amplificar la SEQ ID NO: 2 son los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
- 30 6. Método según cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la amplificación del paso (c) se lleva a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

7. Método según cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* se seleccionan de la lista que comprende: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6.
- 5 8. Cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
9. Cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
- 10 10. Uso de los cebadores según cualesquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 para la detección de cualesquiera de las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.
- 15 11. Uso de los cebadores según cualesquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 para la cuantificación de cualesquiera de las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.
- 20 12. Uso de los cebadores según cualesquiera de las reivindicaciones 10 u 11 donde las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* se seleccionan de la lista que comprende: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6.
- 25 13. Kit de detección y cuantificación de cualesquiera de las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* que comprende una pareja de cebadores capaz de amplificar la SEQ ID NO: 1 y/o una pareja de cebadores capaz de amplificar la SEQ ID NO: 2.
- 30 14. Kit según la reivindicación 13 donde los cebadores capaces de amplificar la SEQ ID NO: 1 son los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
15. Kit según cualesquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 donde los cebadores capaces de amplificar la SEQ ID NO: 2 son los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

16. Uso del kit según cualesquiera de las reivindicaciones 13 a 15 para la detección y cuantificación de cualesquiera de las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.
- 5 17. Uso del kit según la reivindicación 16 donde las razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* se seleccionan de la lista que comprende: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6.

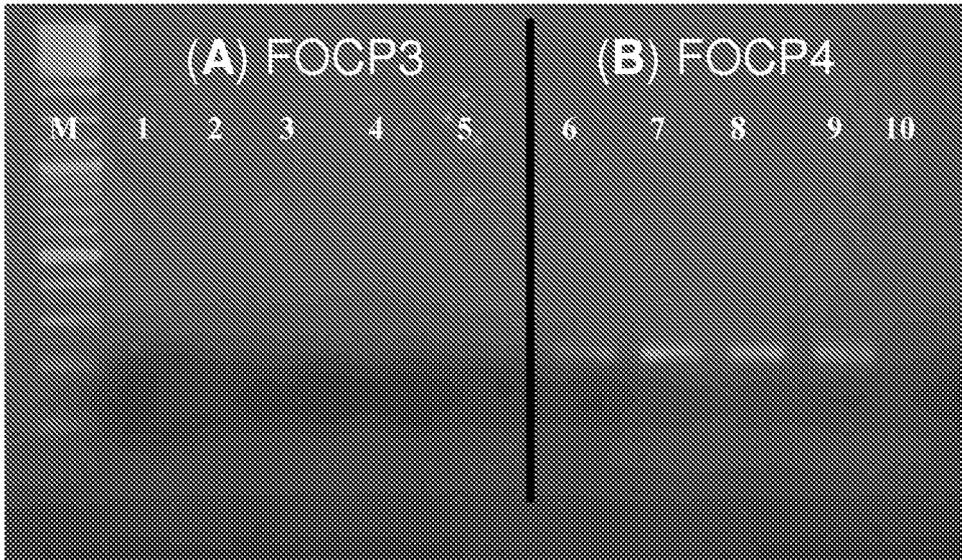


FIG. 1

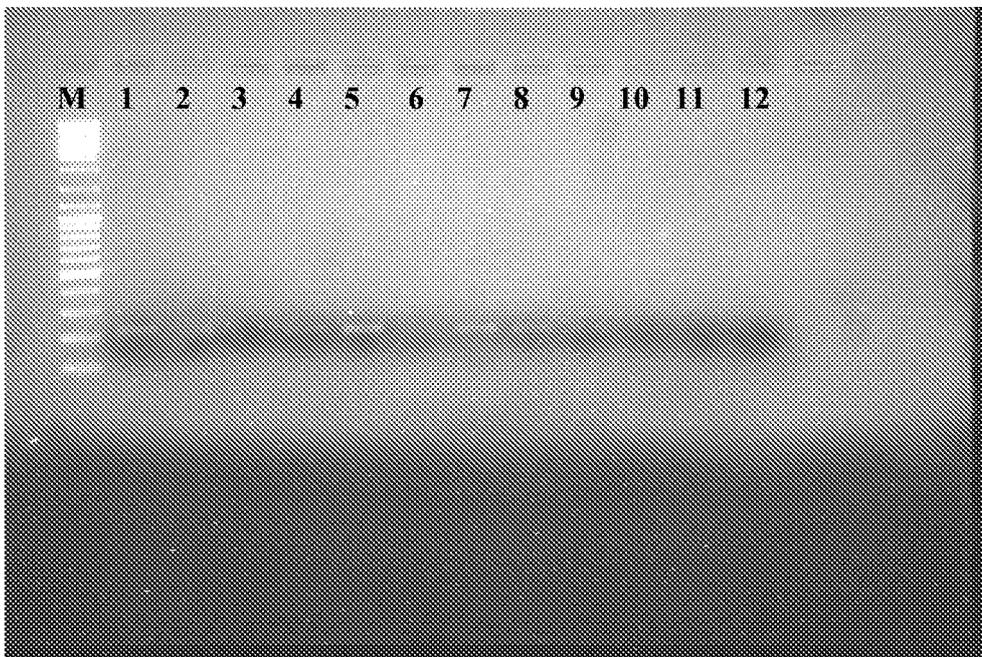


FIG. 2

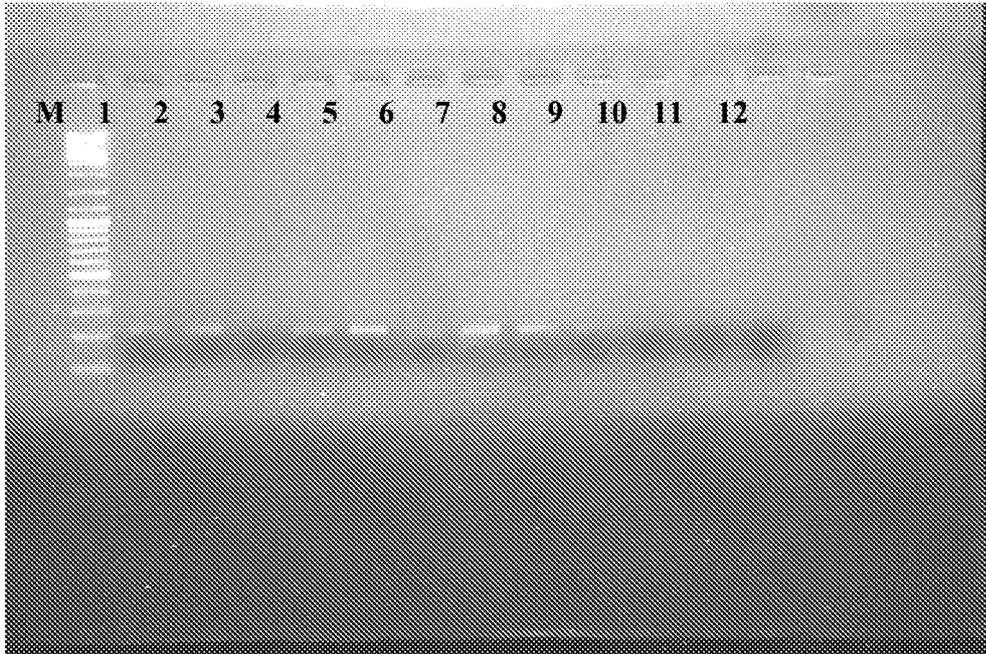


FIG. 3

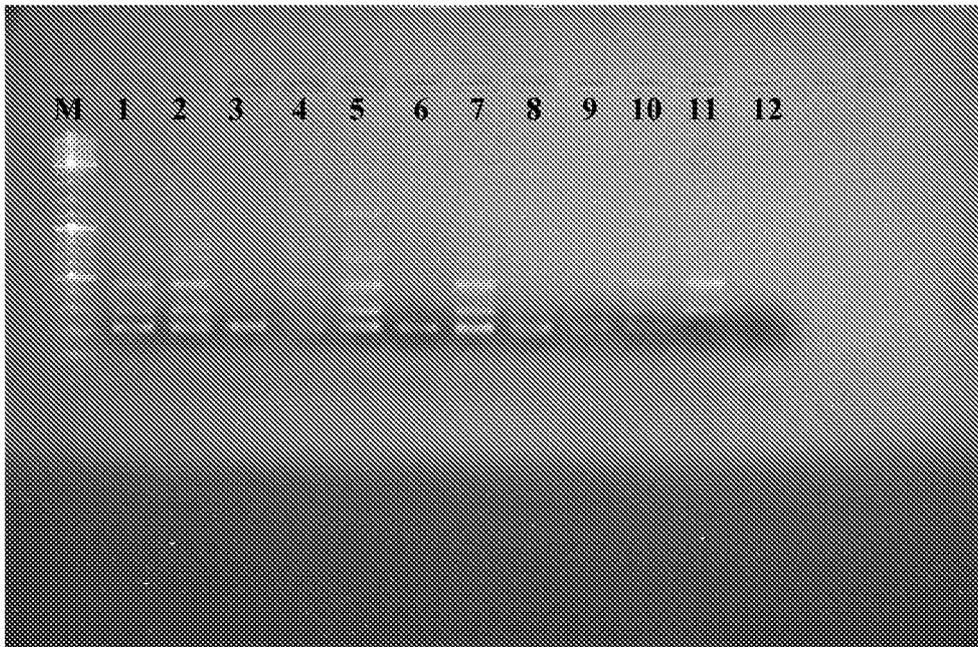


FIG. 4



FIG. 5

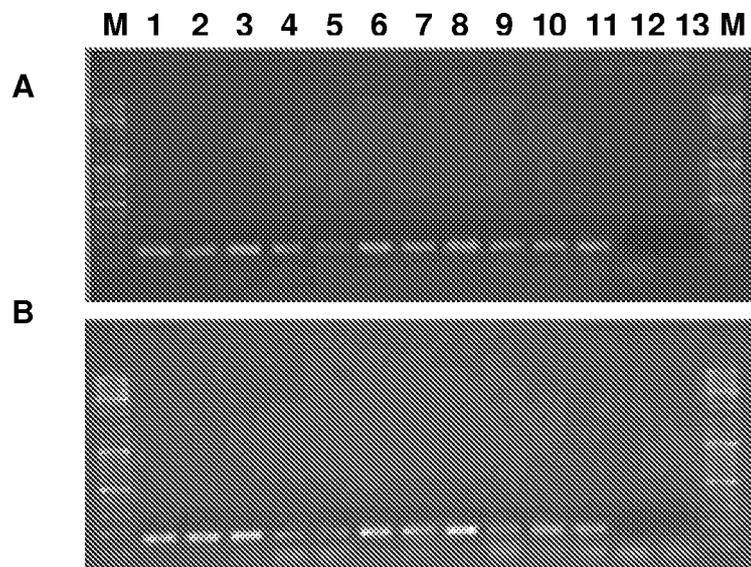


FIG. 6

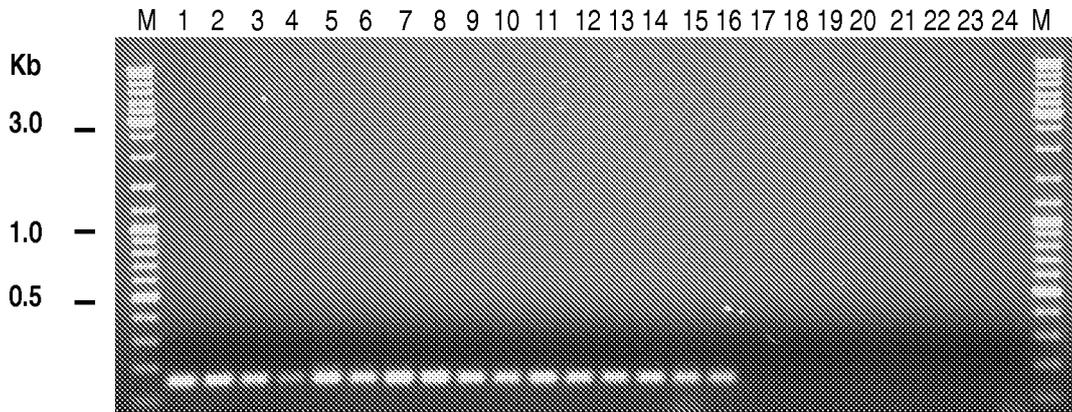


FIG. 7

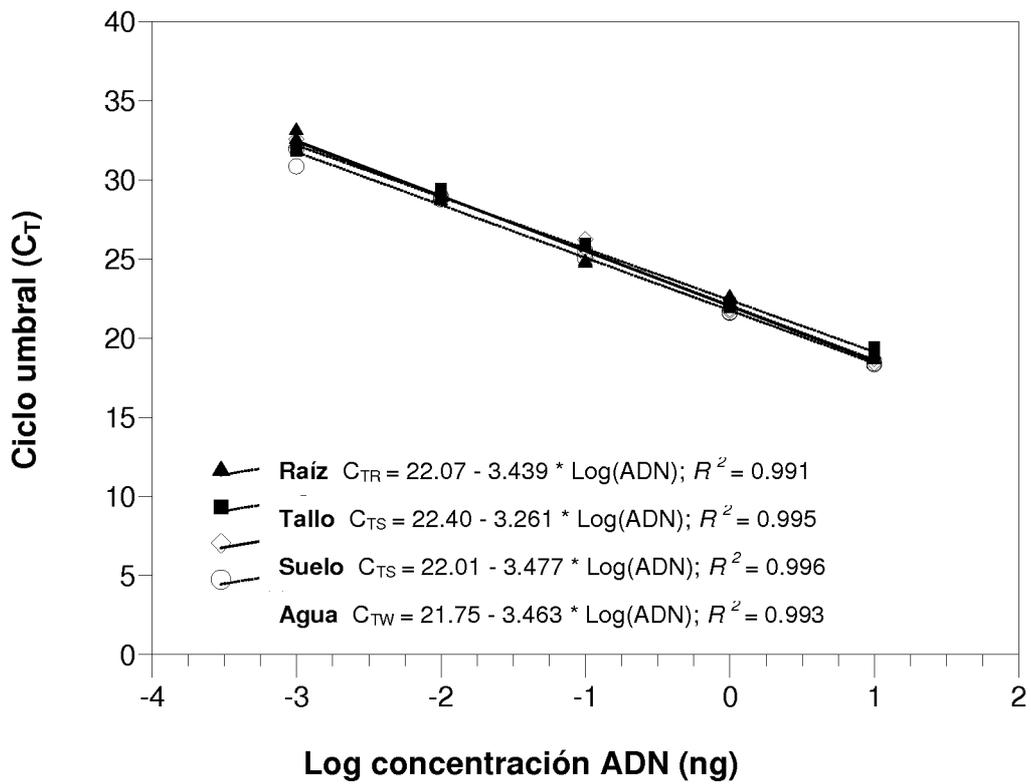


FIG. 8

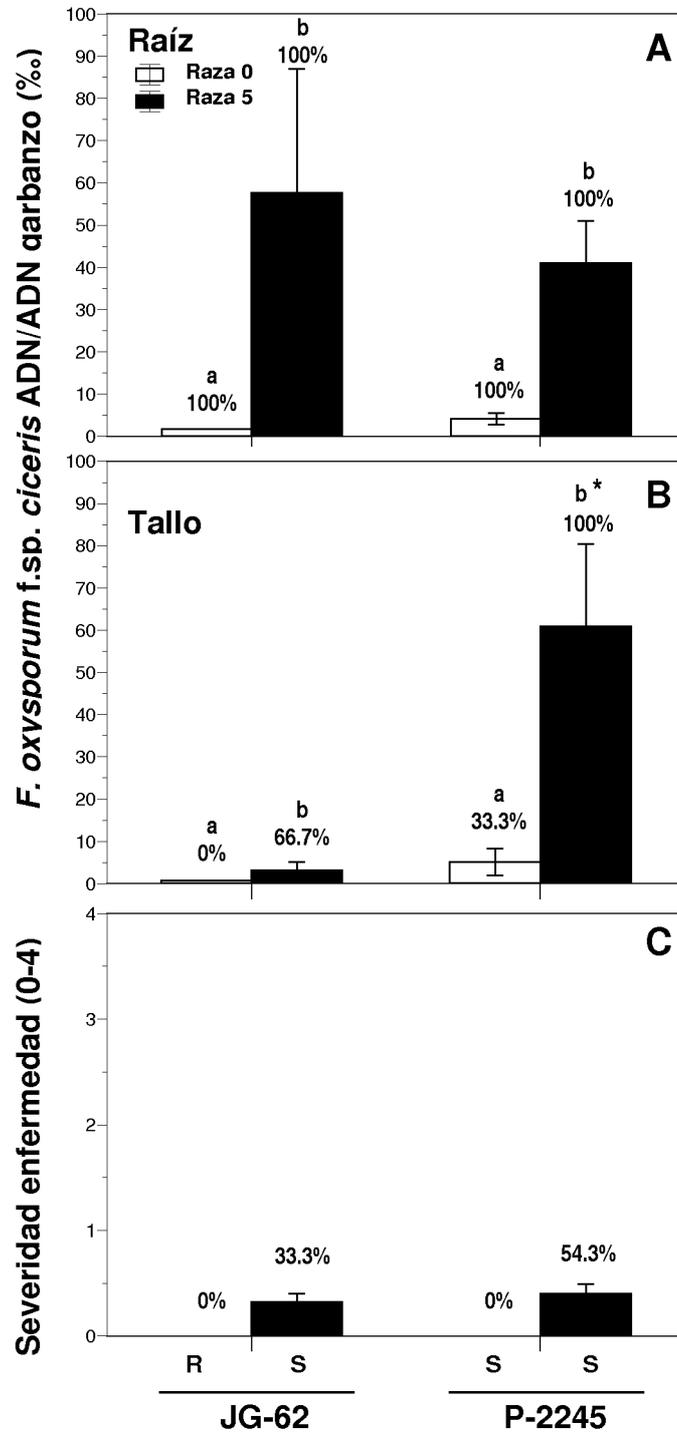


FIG. 9

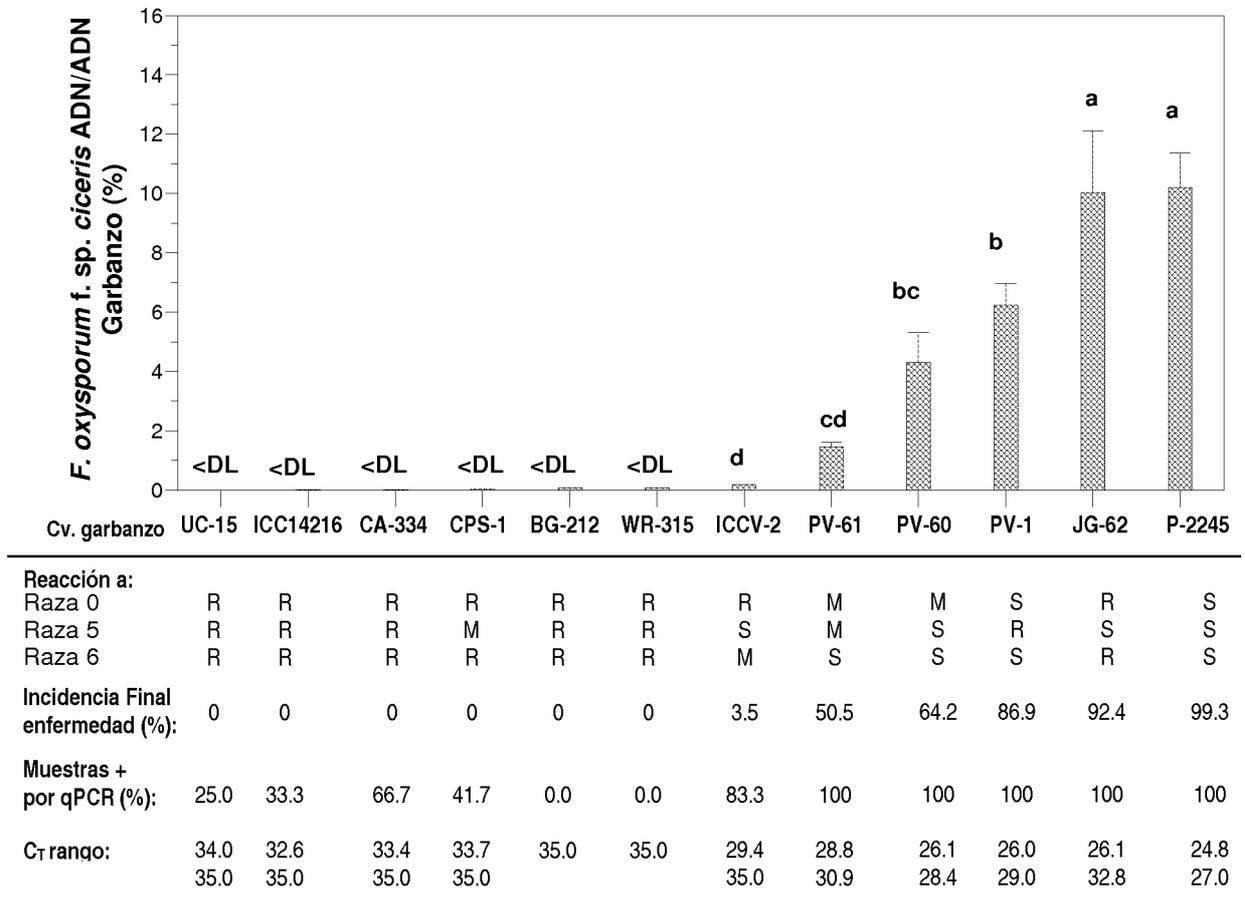


FIG. 10

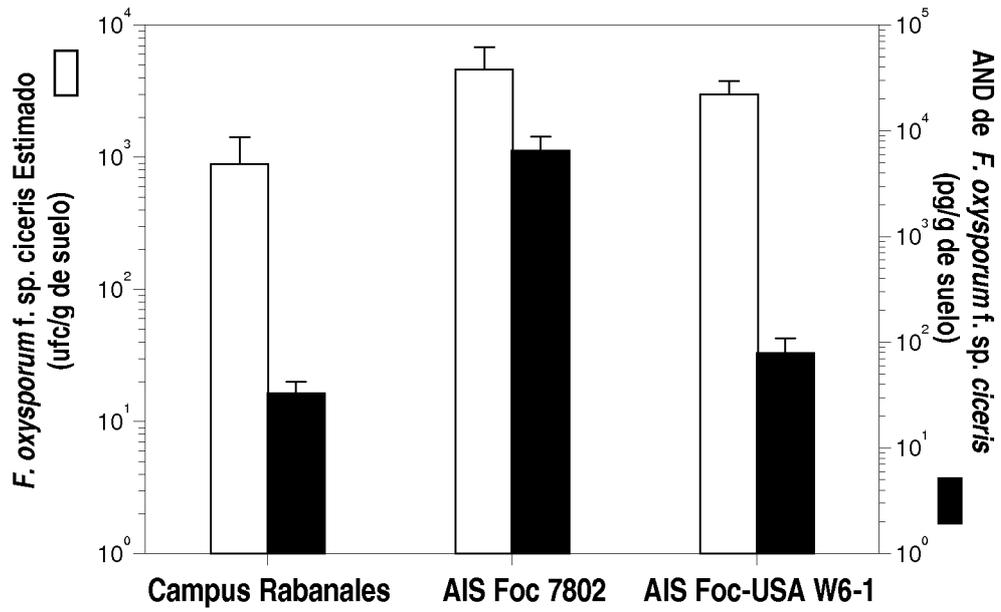


FIG. 11

# ES 2 385 905 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)  
 Universidad de Córdoba

<120> "Método de detección y cuantificación de las razas patogénicas  
 del hongo Fusarium oxysporum f. sp. ciceris"

<130> ES1641.810

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 160  
 <212> DNA  
 <213> Fusarium oxysporum

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (51)..(51)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (114)..(114)  
 <223> r is a, or g

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (132)..(132)  
 <223> k is g, or t

<400> 1  
 tacggtacca gatcatggcg tttcgcagcc ttacaatgaa gagggcccca ngctgcccag 60  
 cggcgtacaa aggatgtgaa gatattattc aaagaaaact atccaaagta ccgrcaactt 120  
 aatcggatcg gkccaacata catagccacg atcgaaagcg 160

<210> 2  
 <211> 158  
 <212> DNA  
 <213> Fusarium oxysporum

<400> 2  
 catggtttcg ttaggccagt ggactacgct actatcagca taacaaacgt tttggactgg 60  
 taacgtgta acggctattt ctaaaggagt gactctcaat ctgtggtttg tggaaaaggc 120  
 gcggtctcat ggctttatta atgacgacga agactgcg 158

<210> 3  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador directo de la pareja de cebadores FOCP1

<400> 3  
 tacggtacca gatcatggcg t 21

ES 2 385 905 A1

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de la pareja de cebadores FOCP1

<400> 4  
cgctttcgat cgtggctatg 20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador directo de la pareja de cebadores FOCP2

<400> 5  
catggtttcg ttaggccagt 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de la pareja de cebadores FOCP2

<400> 6  
cgcagtcctc gtcgctatta 20

<210> 7  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador directo de la pareja de cebadores FOCP3

<400> 7  
gctactatca gcataacaaa cg 22

<210> 8  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de la pareja de cebadores FOCP3

<400> 8  
gtccttcaca ccatcatcc 19

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador directo de la pareja de cebadores FOCP4

ES 2 385 905 A1

<400> 9  
aaaccaagca gtgtgaatac c 21

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de la pareja de cebadores FOCP4

<400> 10  
ctctcctagc ctccaagtcc 20



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031615

②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.11.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)  
C12R1/77 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JIMENEZ-FERNANDEZ DANIEL et al., "Identification and quantification of Fusarium oxysporum in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay". Applied Soil Ecology (2010), vol. 46, pág. 372-382. <a href="http://dx.doi.org.10.1016/j.apsoil.2010.10.01">http://dx.doi.org.10.1016/j.apsoil.2010.10.01</a> (disponible online 02.11.2010), todo el documento.	1-17
A	MARÍA DEL MAR JIMÉNEZ-GASCO y RAFAEL M. JIMÉNEZ-DÍAZ "Development of a Specific Polymerase Chain Reaction-Based Assay for the Identification of Fusarium oxysporum f. sp. cicerisand Its Pathogenic Races 0, 1A, 5, and 6" Phytopathology (2003), Vol. 93, No. 2, pág. 200-209, todo el documento.	1-17

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  
09.07.2012

Examinador  
M. Hernández Cuéllar

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12R, C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.07.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JIMENEZ-FERNANDEZ DANIEL et al., "Identification and quantification of Fusarium oxysporum in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay". Applied Soil Ecology (2010), vol. 46, pág. 372-382. <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.01">http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.01</a> (disponible online 02.11.2010), todo el documento.	
D02	MARÍA DEL MAR JIMÉNEZ-GASCO y RAFAEL M. JIMÉNEZ-DÍAZ "Development of a Specific Polymerase Chain Reaction-Based Assay for the Identification of Fusarium oxysporum f. sp. ciceris and Its Pathogenic Races 0, 1A, 5, and 6" Phytopathology (2003), Vol. 93, No. 2, pág. 200-209, todo el documento.	

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente invención proporciona un método, basado en PCR convencional o cuantitativa en tiempo real (qPCR), para la detección y cuantificación de cualesquiera de las ocho razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6) en una muestra biológica aislada. El método comprende:

- extraer el ADN de una muestra biológica aislada,
- poner en contacto el ADN extraído en el paso (a) con una mezcla de reacción que comprende una pareja de cebadores capaz de amplificar la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2,
- amplificar la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, y
- detectar y/o cuantificar el producto de amplificación obtenido en el paso (c).

En una realización preferida los cebadores del paso (b) del método de la invención capaces de amplificar la SEQ ID NO: 1 son los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. En otra realización preferida, los cebadores del paso (b) del método de la invención capaces de amplificar la SEQ ID NO: 2 son los cebadores de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

El documento D01 describe la identificación y cuantificación de *Fusarium oxysporum* en planta y suelo mediante un ensayo específico de PCR cuantitativa. Este ensayo consiste en una mejora de las condiciones del ensayo descrito por Mishra et al. (2003) en el que usaban los cebadores específicos FOF1 y FOR1 de la región ITS del rDNA. De acuerdo a la información aportada por los autores de D01, sorprendentemente estos cebadores presentaban amplificación cruzada con distintas especies de *Fusarium* diferentes de *Fusarium oxysporum*.

El documento D02 describe un ensayo PCR para la identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* y sus variantes patogénicas 0, 1A, 5 y 6. Los cebadores utilizados en este ensayo ( tabla 2 ) se generaron a partir de secuencias SCARs y marcadores informativos RAPD.

**1.- NOVEDAD**

Ninguno de los documentos del estado de la técnica establecido en la búsqueda describe un método igual al de la invención. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-17 son nuevas de acuerdo al Art. 6.1 LP 11/1986.

**2.- ACTIVIDAD INVENTIVA**

Los documentos D01 y D02 conforman el estado de la técnica más cercano a la invención.

La diferencia entre D01 y el objeto de la presente invención radica en que en D01 se utilizaron cebadores específicos de la región ITS del rDNA y los cebadores de la invención son específicos de la secuencia SCARs. Como resultado los cebadores de D01 presentaban amplificación cruzada con distintas especies de *Fusarium* diferentes de *Fusarium oxysporum* mientras que los cebadores utilizados en el método de la invención son capaces de distinguir específicamente cualesquiera de las ocho razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6) en una muestra biológica aislada.

Los cebadores descritos en D02 aunque específicos de la secuencia SCAR son distintos a los descritos en la invención y con ellos solo se pueden identificar las variantes patogénicas 0, 1A, 5 y 6.

En este sentido esta oficina considera que de ninguno de los documentos tomados solos o en combinación se deriva de forma obvia el diseño de los cebadores del método con el cual se puede cuantificar y distinguir cualesquiera de las ocho razas patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 ó 6) en una muestra biológica aislada. Por tanto, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-17 cumplen con la actividad inventiva requerida en el Art. 8.1 LP 11/1986.