

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 577**

21 Número de solicitud: 201331633

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

08.11.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.05.2015

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

18.05.2015

Fecha de la concesión:

19.02.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

26.02.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE JAÉN (70.0%)
Campus Las Lagunillas, s/n Edf. B1
23071 Jaén (Jaén) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (30.0%)**

72 Inventor/es:

**LUQUE VÁZQUEZ, Francisco;
BARROSO ALBARRACÍN, Juan Bautista;
LEYVA PÉREZ, Maria De La O y
MERCADO BLANCO, Jesús**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VERTICILOSIS EN EL OLIVO**

57 Resumen:

Método para el diagnóstico de verticilosis en el olivo. La presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada del genoma del olivo que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2, y que se sobreexpresa en respuesta a una infección por *Verticillium* spp. Por lo tanto, la invención se relaciona con un método para detectar la presencia de *Verticillium* spp. en un olivo que comprende determinar el nivel de expresión de dicha secuencia de nucleótidos o el nivel de proteína codificada por dicha secuencia en una muestra procedente de dicho olivo y, si dicha expresión es mayor que un valor de referencia, entonces se puede concluir que el olivo está infectado con *Verticillium* spp., diagnosticando así verticilosis.

ES 2 535 577 B1

Método para el diagnóstico de verticilosis en el olivo

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos del genoma del olivo y su uso en el diagnóstico de verticilosis. Por lo tanto, la presente invención se engloba dentro del campo fitosanitario.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

El estado fitosanitario del olivar andaluz se enfrenta al reto del importante avance que la Verticilosis está teniendo en los últimos años. La pérdida de árboles por enfermedades producidas por patógenos del suelo, como la mencionada Verticilosis, causada por el hongo *Verticillium dahliae*, o la denominada “seca” producida por especies del género oomiceto *Phytophthora*, supone un coste importante para muchas explotaciones. No se dispone de métodos de detección precoz de estas enfermedades y, una vez producidas, determinar cuál ha sido el agente infeccioso es demasiado complejo como para que en la práctica se utilice de forma rutinaria. De esta forma lo más habitual es que cuando en una plantación se produce la pérdida de un olivo (si bien es más frecuente la afectación de varios) por alguna de estas patologías caracterizadas por síndromes parecidos y fácilmente confundibles, no se determine el agente causal de la enfermedad.

15

20

25

30

35

Evidentemente, la ausencia de un diagnóstico exacto impide la correcta evaluación de las causas y la toma adecuada de soluciones. Sin embargo, aun siendo importante determinar la causa por la que se secan los árboles en plantaciones afectadas, más importante aún es evitar la diseminación de material de plantación afectado aunque asintomático, ya que pueden estar introduciendo en nuevas plantaciones inóculos de los agentes etiológicos de estas enfermedades. Teniendo en cuenta la preocupante expansión actual de la Verticilosis deberían extremarse las medidas para evitar la diseminación del patógeno a zonas no afectadas. En este sentido la calidad fitosanitaria de los plantones suministrados por los viveristas debería estar certificada mediante métodos diagnósticos fiables y lo suficientemente sencillos como para utilizarse de forma rutinaria en los árboles/plantones aparentemente sanos antes de ser vendidos a los agricultores. De hecho, esta necesidad se encuentra plasmada en el Real Decreto 1678/1999, de 29 de octubre, por el que se modifica el Real Decreto

929/1995, de 9 de junio, por el que se aprueba el Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de frutales, Disposición Transitoria Única: Plantas madre de olivo, se determinan los patógenos para los que debe certificarse que las plantas de viveros están libres: Hongos: *Verticillium dahliae*; Bacterias: *Pseudomonas savastanoi* (Tuberculosis); Virosis o similares: Mosaico del Arabis (ArMv), Enrollado del ciruelo (CLRV), Mosaico del pepino (CMV) y Virus latente de las manchas anulares de la fresa (SLRV).

No obstante, en la actualidad es difícil para los viveristas garantizar que las plantas que suministran están realmente libres de patógenos, especialmente en el caso de *Verticillium dahliae*. Esto se debe a que los métodos diagnósticos que existen necesitan de laboratorios muy especializados, son caros y no garantizan la detección precoz de la enfermedad, por lo que plantas aparentemente sanas, pero infectadas, pueden estar siendo distribuidas y contribuyendo a la dispersión de la enfermedad. Estos métodos están basados en la identificación del patógeno en medios de cultivo, o en procedimientos moleculares basados en distintos protocolos de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”, PCR) (Mercado-Blanco *et al.*, 2001 .Plant Pathol. 50:609-619; Mercado-Blanco *et al.*, 2002. European Journal of Plant Pathology 108: 1-13; Mercado-Blanco, J. *et al.* 2003. Plant Dis. 87:1487-1494; Morera, B., Páez, JI. , Vega JM., and Montes F. 2005. Comparación de métodos de diagnóstico de *Verticillium dahliae* en olivo: Aislamiento en medio de cultivo y PCR. Bol. San. Veg. Plagas, 31:267-275; Collado-Romero *et al.*, 2009. Plant Pathology 58:515–526; López-Escudero, F.J. y Mercado-Blanco, J. 2011. Plant Soil, 344: 1-50). Entre las limitaciones de la PCR está el hecho de que en las épocas en las que el hongo no es activo, como son el verano y el invierno, suelen dar falsos negativos (Morera *et al.* 2005, citado *ad supra*), además de que al tratarse de procedimientos de PCR-“NESTED” (PCR secuencial o anidada), altamente sensible pero también fácilmente contaminable, supone una complicación más para su uso generalizado ya que se requiere de laboratorios especializados y personal con experiencia. En cuanto al diagnóstico/detección por métodos tradicionales (aislamiento e identificación en medios de cultivo microbiológicos), a pesar de ser de más fácil implementación, es más lento, ocasionalmente inconsistente, y ofrece resultados menos sensibles que la PCR. Por lo tanto, podemos concluir que el requerimiento de laboratorios especializados y personal cualificado para realizar el diagnóstico de la verticilosis hace que en la práctica no se esté utilizando de forma habitual ningún método diagnóstico.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar nuevos métodos de diagnóstico de verticilosis que solventen los inconvenientes anteriormente mencionados.

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores de la presente invención han descubierto que cuando un olivo es infectado por *Verticillium* spp., el agente causal de la verticilosis, se produce una alteración en el perfil de expresión génica del olivo, en particular, se produce la sobreexpresión de un gen no descrito previamente en el estado de la técnica y que ha sido identificado en la presente invención como contig_172143. Para ello, los inventores realizaron un estudio transcriptómico de plantas de olivo en condiciones de estrés e inoculadas con *Verticillium dahliae* mediante la secuenciación del ARN total del olivo de estudio, y seleccionaron un ARN mensajero (ARNm) cuya expresión solo se observa en plantas inoculadas con *V. dahliae* (Ejemplo 1). El ADN complementario (ADNc) correspondiente a dicho ARNm se denominó contig_172143 y presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Por otro lado, la traducción de dicha secuencia de ARNm corresponde con una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un marcador genético que permite detectar una infección por *Verticillium* spp. en el olivo, permitiendo a su vez el diagnóstico de la verticilosis mucho antes de que aparezcan los primeros síntomas asociados a dicha infección o cuando dicha infección está latente. Basado en este descubrimiento, los inventores han desarrollado un método de diagnóstico de la verticilosis en el olivo que solventa todos los inconvenientes que existen en el estado de la técnica, pues dicho método es más sensible y más rápido que los métodos tradicionales de cultivo del microorganismo, permite una detección precoz de *Verticillium* spp. (es decir, permite su detección en plantas asintomáticas) evitando así la diseminación del material infectado y evita la aparición de falsos negativos debido a que es posible detectar la presencia de *Verticillium* spp. e incluso cuando el hongo está inactivo.

A continuación, se describe en detalle el método de diagnóstico desarrollado, así como otros aspectos inventivos derivados del mismo.

Secuencia de nucleótidos de la invención y sus usos

5 Tal como se ha explicado previamente, los inventores de la presente invención han descubierto que cuando una planta es infectada por *Verticillium* spp., se produce la sobreexpresión de un nuevo gen, cuyo cDNA se ha denominado contig_172143 (SEQ ID NO: 1), y que codifica para una proteína que presenta la secuencia SEQ ID NO: 2.

10 Así, en un primer aspecto, la presente invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos aislada, de aquí en adelante, secuencia de nucleótidos de la invención, que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 2

15 MGCQIRLLMLFGTLISFASVVL SKQGTSVYYARPYLPSACYGNRNQGIMIAGANPTLYNGGKVC
GRRYKVRCLGGTNKTPHPCKRGEITVKIVDLCPGCGANEINLSQDAFSRIANLKAGRVRIDYIQ
V

20 En la presente invención se entiende por “identidad” o “identidad de secuencia” al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenido mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante
25 algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST [Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10]. Los programas BLAST (BLASTN, BLASTX, y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN) son de dominio público en la página web del Centro Nacional para la Información sobre Biotecnología o NCBI (*National Center
30 for Biotechnonology Information*).

El experto en la materia entiende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en
35 posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad. Dichas variantes caen dentro del ámbito de la presente invención. Están incluidas

también dentro del ámbito de la invención aquellas variantes de la secuencia de aminoácidos que presenten inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos respecto a dicha SEQ ID NO: 2, y conserven, además, la misma característica que dicha secuencia SEQ ID NO: 2, es decir, que su presencia en la célula es el resultado de la sobreexpresión del gen que la codifica como respuesta a una infección por *V. dahliae*.

En una realización particular, la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95%, en particular al menos un 98%, más en particular, al menos un 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2.

En otra realización todavía más particular, la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2.

Por otro lado, en otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención puede ser ARN o ADNc.

Como sabe el experto en la materia, el ADNc es el resultado de la retrotranscripción del ARNm. En la presente invención, el ADNc resultante de la transcripción de la secuencia SEQ ID NO: 2, comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.

Por lo tanto, en una realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención es ADNc que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 90%, preferiblemente al menos un 95% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1, siendo dicha secuencia SEQ ID NO: 1 la secuencia de nucleótidos denominada contig_172143.

SEQ ID NO: 1:

ATGGGCTGTCAAATTCGACTTCTTATGTTGTTTGGCACGTTGATAAGTTTTGCCTCAGTTGTAC
 TTTCTAAGCAGGGAACCTTCTGTTTACTATGCTCGACCTTATCTTCCCTCGGCATGCTATGGCAA
 CCGAAACCAAGGCATCATGATAGCAGGTGCTAATCCTACATTGTACAATGGTGGAAAAGTATGT
 GGAAGAAGGTATAAAGTTAGGTGCTTGGGAGGCACCAACAAAACACCACATCCTTGCAAAAGGG
 GTGAAATAACTGTAAAAATTGTAGATCTTTGCCAGGCTGTGGAGCAAACGAGATTAATCTATC

TCAAGATGCCTTCTCGAGGATTGCTAATCTTAAGGCTGGAAGAGTCCGCATCGACTATATCCAG
GTTTGA

5 El significado del término "identidad" o "identidad de secuencia" ha sido definido en párrafos anteriores.

Así, en una realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención es un ADNc que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 96, 97 o 98%, en particular, al menos un 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1. En otra
10 realización todavía más particular, la secuencia de nucleótidos de la invención es un ADNc que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.

Como entiende el experto en la materia, la secuencia de nucleótidos de la invención
15 puede presentar a ambos lados otras secuencias de nucleótidos que pueden corresponder a regiones o zonas no codificantes de la proteína (regiones/zonas UTR). Así, en otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención comprende covalentemente unida a su extremo 5' la secuencia SEQ ID NO: 3 y/o operativamente unida a su extremo 3' la secuencia SEQ ID NO: 4.

20

SEQ ID NO: 3:

GGCCACTAGTACTTCAAACATACAGAGA

SEQ ID NO: 4:

GGCAATTTARTATGRGAAAGTAAAAAATTTTCGATGCTATTCTAAATAAGCTTTTTATAGTATG
25 GCTCATGCAAATATATAATCTAGCACTAGTTGAATAAGAAATTAGACAGAAATCTATTTTAGA
TGTTAGT

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención comprende una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5, que corresponde a la secuencia de
30 nucleótidos que comprende tanto la región codificante como las no codificantes de la proteína.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede estar contenida dentro de una construcción génica. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una
35 construcción génica, de aquí en adelante, construcción génica de la invención, que

comprende la secuencia de nucleótidos de la invención operativamente unida a una secuencia reguladora de la expresión.

5 La secuencia reguladora de la expresión está operativamente unida a la secuencia de nucleótidos de la invención, es decir, que dicha secuencia está dentro del marco de lectura correcto para su expresión bajo el control de dichas secuencias reguladoras. Las secuencias reguladoras útiles para la presente invención pueden ser secuencias promotoras nucleares o, alternativamente, secuencias potenciadoras y/u otras secuencias reguladoras que ayudan a la expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención. Asimismo, la secuencia promotora puede proceder del mismo organismo 10 que la secuencia de nucleótidos de la invención, es decir, de *Olea europaea*, o puede proceder de un organismo distinto, en cuyo caso se trata de una secuencia reguladora de la expresión heteróloga. Así, en una realización particular, dicha secuencia reguladora de la expresión es heteróloga respecto a la secuencia de nucleótidos de la invención. 15

Las secuencias promotoras nucleares o promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Si se desea la expresión constante de la secuencia de nucleótidos, entonces se usa un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores constitutivos muy conocidos 20 incluyen, sin limitar a, los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del poliovirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el promotor del gen de la timidina kinasa del virus del herpes simplex, regiones LTR de los retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobulina, el promotor del gen de la actina y el promotor del gen EF-1alfa. 25 Ejemplos de promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena, incluyen, sin limitar a, el sistema tetraciclina, el sistema NFkappaB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico.

30 Por otro lado, la construcción génica de la invención puede comprender secuencias que codifiquen marcadores de selección, orígenes de replicación, etc. Los marcadores de selección son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Estos marcadores de selección o genes de selección pueden ser genes de resistencia a antibióticos, genes reporteros, como el gen que codifica la beta-Galactosidasa del operón lactosa, 35 etc. Ejemplos de genes de resistencia a antibióticos son, por ejemplo, genes de resistencia a beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, etc), a eritromicina, a

kanamicina, a neomicina, a gentamicina etc. Entre las penicilinas podemos encontrar, entre otros, bencilpenicilina, ampicilina, amoxicilina, etc.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, de aquí en adelante vector de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos o una construcción génica según la presente invención. La obtención de dicho vector puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia.

10 En general, un vector de expresión comprende, además de la secuencia de nucleótidos de la invención, un promotor que dirige su transcripción (por ejemplo, *pT7*, *plac*, *ptrc*, *ptac*, *pBAD*, *ret*, etc.) al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés, por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción (*tft2*, etc.), señal de poliadenilación, origen de replicación, 15 secuencias de unión a ribosomas (RBS), secuencias codificantes de reguladores transcripcionales, (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), represores, etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso. La elección del vector dependerá de la célula huésped y del tipo de uso que se quiera realizar. Por ejemplo, dicho vector 20 puede ser un vector viral (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y, en particular, lentivirus) o no viral (pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAXI, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTI).

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende la secuencia de nucleótidos, la construcción génica o el vector de la invención. Prácticamente cualquier célula huésped (tanto eucariota como procariota) puede usarse en el contexto de la presente invención (por ejemplo células animales, levaduras, células vegetales, etc.) y obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por 30 expertos en la materia.

35 En otro aspecto, la invención se relaciona con una planta que comprende una secuencia de nucleótidos, una construcción génica, un vector o una célula según la presente invención. Preferiblemente, dicha planta pertenece al género *Olea* spp., más preferiblemente, *Olea europaea*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una secuencia de aminoácidos, de aquí en adelante, secuencia de aminoácidos de la invención, codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención. En una realización particular, la secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

5

SEQ ID NO: 2

MGCQIRLLMLFGTLISFASVVLKQGTSSVYYARPYLPSACYGNRNQGIMIAGANPTLYNGGKVC
GRRYKVRCLGGTNKTPHPCKRGEITVKIVDLCPGCGANEINLSQDAFSRIANLKAGRVRIDYIQ
V

10

Como se ha explicado previamente, la presente invención se basa en que cuando un olivo es infectado por *Verticillium* spp., se produce una alteración en el perfil de expresión génica del olivo, en particular, se produce la sobreexpresión de la secuencia de nucleótidos de la invención, pudiendo emplear dicha secuencia como un marcador genético que permite detectar una infección por *Verticillium* spp. en el olivo o, lo que es lo mismo, diagnosticar verticilosis en el olivo.

15

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso *in vitro* de la secuencia de nucleótidos, la construcción génica, el vector, o la secuencia de aminoácidos de la invención como marcador de diagnóstico para la verticilosis del olivo.

20

En una realización particular, la verticilosis del olivo es causada por una infección de *Verticillium* spp., en particular, por una infección de *Verticillium dahliae*.

25

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos está sobreexpresada respecto a un valor de referencia, o la secuencia de aminoácidos está en una alta concentración respecto a un valor de referencia.

30

Los detalles sobre cómo usar la secuencia de nucleótidos de la invención para detectar la infección por *Verticillium* sp. en el olivo se describirán a continuación en el método de la invención.

Método de la invención

Tal como se ha descrito en el apartado anterior, la presente invención se basa en el hecho de que el olivo, en respuesta a una infección por *Verticillium* spp., cambia su patrón de expresión génica produciéndose la sobreexpresión de un nuevo gen que codifica la proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 y cuyo ADNc ha sido aquí identificado como contig_172143 (SEQ ID NO: 1). Por lo tanto, dicha sobreexpresión es indicativa de que el olivo ha sido infectado por *Verticillium* spp., pudiendo emplear dicho gen como un marcador de la infección.

10

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para detectar la presencia de *Verticillium* spp. en un olivo, de aquí en adelante, método de la invención, que comprende:

15

a) determinar el nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención o el nivel de la secuencia de aminoácidos de la invención en una muestra biológica procedente de dicho olivo; y

b) comparar el nivel de expresión obtenida en el apartado a) con un valor de referencia.

20

En una primera etapa [etapa a)], el método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención o el nivel de la secuencia de aminoácidos de la invención (proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención) en una muestra biológica procedente de un olivo.

25

En la presente invención, se entiende por “muestra biológica” a cualquier muestra que sea susceptible de contener ADN. Así, muestras biológicas procedentes de un olivo incluyen, pero no se limitan a, muestras de raíces, hojas, corteza, ramas, yemas y brotes. Así, en una realización particular del método de la invención, la muestra biológica procede de una hoja, del tronco, de la corteza o de la raíz del olivo.

30

El olivo (*Olea europaea*) es un árbol perennifolio, longevo, que puede alcanzar hasta 15 m de altura, con copa ancha y tronco grueso, retorcido y a menudo muy corto, que limita su área de distribución preferentemente a zonas de clima mediterráneo. El método de la invención puede llevarse a cabo sobre cualquier subespecie de olivo, tales como *Olea europaea* subsp. *europaea*, *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *Sylvestris*, *O. europaea* subsp. *cuspidata*, *O. europaea* subsp. *guanchica*, *O. europaea*

35

subsp. *cerasiformis*, *O. europaea* subsp. *maroccana*, *O. europaea* subsp. *laperrinei*, etc., o sobre cualquier variedad del olivo. Ejemplos de variedades de olivo incluyen, sin limitar a, Picual o Martaña o Lopereña o Nevadillo blanco, Picudo, Hojiblanca, Verdial, Arbequina, Empeltre, Cornicabra, Lechín, Manzanilla, Gordal, Morona o Dulzal, Budiega o Morcaleña y Cornezuelo.

Asimismo, el olivo objeto del método de diagnóstico de la invención puede encontrarse en cualquier estadio de desarrollo, es decir, puede ser un plantón o un olivo adulto.

El nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención puede determinarse midiendo el ARNm resultante de la transcripción de la secuencia de la invención o, alternativamente, a partir del ADNc obtenido a partir del ARNm. Para ello, es necesario extraer el ácido nucleico de la muestra biológica del olivo.

La extracción del ácido nucleico puede llevarse a cabo por técnicas estándar ampliamente conocidas por el experto en la materia. La muestra biológica se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o la célula, liberando los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica. En general, la extracción del ácido nucleico consta de una etapa de lisis, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido, y otra de purificación, que implica la retirada de la solución final de los elementos contaminantes, es decir, aquellos que no son ácido nucleico.

La extracción de ARN es más compleja que la del ADN debido a la alta estabilidad y actividad de las ribonucleasas, enzimas que degradan el ARN. Por tanto, es muy importante trabajar con materiales y productos libres de ribonucleasas. El primer paso para el aislamiento del ARN comprende, por ejemplo, en la lisis de las células en un medio químico que destruya las ribonucleasas, como el tiocianato de guanidinio. Posteriormente, el ARN es separado de las demás macromoléculas en un gradiente, por ejemplo, de cloruro de cesio, precipitado con isopropanol, lavado con etanol al 75% y resuspendido en una solución acuosa.

Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificado por la secuencia de nucleótidos de la invención o de su ADNc correspondiente. A modo

ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm de la secuencia de interés o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-LCR, hibridación, microarrays, etc. Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente a dichos ARNm codificados por la secuencia de nucleótidos de la invención también pueden ser cuantificados mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc.

Alternativamente al ARNm, en la puesta en práctica del método de la invención, también puede determinarse el nivel de la secuencia de aminoácidos de la invención, es decir, de la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención, para detectar la presencia de *Verticillium* spp. en un olivo.

Para ello, primero es necesario extraer las proteínas de las células, lo que puede realizarse mediante técnicas convencionales ampliamente conocidas por el experto en la materia, como rotura de las células para liberar las componentes celulares [macerado en mortero y pistilo, congelación, sonicación, lisis por métodos químicos (detergentes) o enzimáticos (lisozima)] y la posterior centrifugación.

En la presente invención se entiende por “el nivel de la secuencia de aminoácidos de la invención” a la concentración o cantidad de la secuencia de aminoácidos (o proteína) codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención que está presente una muestra biológica.

El nivel de la secuencia de aminoácidos de la invención puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dichas proteínas en una muestra. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dichas proteínas pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a dichas proteínas (o a fragmentos de las mismas que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no.

Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que
 5 utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e
 10 inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc.

15 Por lo tanto, en una realización particular, el que el nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos se lleva a cabo mediante northern blotting o PCR cuantitativa, y el nivel del proteína codificada por la secuencia de la invención el mediante Western blotting.

20 Una vez que se ha determinado el nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención o el nivel de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención, se procede a llevar a cabo la etapa b) del método, que comprende comparar el nivel obtenido en la etapa a) del método con una valor de referencia.

25 En la presente invención, se entiende por “valor de referencia” al nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención o al nivel de proteína (secuencia de aminoácidos) codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención en un olivo sano, es decir, un olivo no infectado por *Verticillium* spp.

30 Tras comparar ambos niveles de expresión o niveles de proteína, se puede concluir que si el nivel de expresión obtenido en el apartado a) es mayor que el valor de referencia, entonces el olivo está infectado por *Verticillium* spp., en particular, *Verticillium dahliae*.

35

Kit de la invención

Adicionalmente, la invención se relaciona con un kit para la puesta en práctica del método de la invención, es decir, que comprende los reactivos útiles para detectar los niveles de expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención o los niveles de proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante, kit de la invención, que comprende

- Una pareja de cebadores específicos de la secuencia de nucleótidos de la invención,
- Una sonda de ácido nucleico diseñada de forma específica para hibridar con la secuencia de nucleótidos de la invención, y/o
- Un anticuerpo específico del péptido o proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención.

Por “kit” se entiende, en el contexto de la presente invención, un producto que contiene los diferentes reactivos para poner en práctica el método de la invención, empaquetados para permitir su transporte y almacenamiento. Materiales adecuados para el empaquetamiento de los componentes del kit incluyen, sin limitar a, cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares.

En la presente invención se entiende por “cebador” o “primer” u “oligonucleótido” (“oligo”) a la secuencia de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN. Los cebadores son secuencias nucleotídicas cortas, frecuentemente entre 15-35 nucleótidos de longitud que se pueden alinear con una hebra de ADN diana gracias a la complementariedad de bases para formar un híbrido entre el cebador y la hebra diana de ADN. Después, la enzima ADN polimerasa puede extender el cebador a lo largo de la hebra diana de ADN.

En el contexto de la presente invención se entiende por “pareja de cebadores” o “primer pair”, al conjunto de dos cebadores que, empleados en una misma reacción de amplificación o PCR, permiten obtener múltiples copias de una secuencia diana de ADN. Cada uno de los cebadores hibrida con la secuencia diana, de manera que se amplifica la secuencia de nucleótidos acotada mediante cada pareja de cebadores.

En una realización particular, las parejas de cebadores específicos de la secuencia de nucleótidos de la invención está formada por un cebador directo que comprende la secuencia de nucleótidos AAT CTT AAG GCT GGA AGA GTC CGC ATC (SEQ ID NO: 6) y un cebador inverso que comprende la secuencia de nucleótidos GCC ATA CTA TAA AAA GCT TAT TTA GAA TAG CAT CG (SEQ ID NO: 7).

El kit de la invención además de comprender al menos una de las parejas de cebadores antes indicadas, puede incluir, opcionalmente, los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de amplificación multiplex, entre los que se incluyen, sin limitar a, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), iones divalentes y/o monovalentes, una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa, ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas, etc. No obstante, si el kit de la invención no comprende los reactivos necesarios para poner en práctica el método de la invención, éstos están disponibles comercialmente y pueden encontrarse formando parte de un kit. Cualquier kit de los disponibles comercialmente que contenga los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación, como por ejemplo Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA), puede emplearse con éxito en la puesta en práctica del método de la invención. Asimismo, otros de los reactivos empleados en la puesta en práctica del método de la invención y que pueden formar parte del kit son el material necesario para obtener la muestra biológica del olivo y los reactivos empleados en el aislamiento del ácido nucleico o proteínas a partir de la muestra biológica obtenida, como por ejemplo, alcoholes, detergentes, etc.

Por otro lado, el kit de la invención también puede contener una sonda de ácido nucleico diseñada de forma específica para hibridar con la secuencia de nucleótidos de la invención. Una sonda específica de secuencia puede dirigirse para hibridizar el ADN, ARN, o ADNc. Una "sonda de ácido nucleico", tal como se utiliza en la presente invención, puede ser una sonda de ADN o una sonda de ARN que hibrida con una secuencia complementaria. La sonda de ácido nucleico puede ser de cualquier tamaño adecuado, siempre y cuando suficiente para hibridar específicamente bajo condiciones severas el ARN apropiado o ADN. La sonda puede ser de entre 5-100 nucleótidos, preferiblemente, entre 10-50 nucleótidos de longitud, más preferiblemente, entre 12-30 nucleótidos de longitud. Como sabe el experto en la

materia, la sonda puede comprender una fracción fluorescente o un grupo en su extremo 3' y un extintor en su extremo 5'.

5 El kit de la invención también puede contener un anticuerpo específico del péptido o proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención.

10 El término "anticuerpo" ha de ser interpretado de forma amplia e incluye, sin limitarse a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, quiméricos, recombinantes, humanizados y fragmentos de los mismos [F(ab')₂, Fab, scFv, etc.], siempre que sean capaces de reconocer al antígeno de interés, es decir, que sean capaces de unirse específicamente a la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención.

15 Adicionalmente, los kits pueden contener instrucciones para el empleo de los distintos componentes que se encuentran en el kit.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de del kit de la invención para detectar la presencia de *Verticillium* spp. en un olivo, en particular, *Verticillium dahliae*.

20 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 figuras se proporcionan a modo de ilustración, y
25 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **Figura 1.** Representación gráfica de la expresión del contig_172143 a lo largo del tiempo a partir de la infección con el patógeno.

Figura 2. Representación gráfica donde se muestra como el contig_172143 responde a la infección tanto de Picual (susceptible) cómo de Frantoio (tolerante-resistente) a *V. dahliae*. Pic= Picual; Fr= Frantoio; ctrl= control; H= heridas en las raíces; inf= infectado por *V. dahliae*; 15d= 15 días desde la inoculación o la herida.
35

Figura 3. Gel de electroforesis donde se muestra que el contig_172143 se expresa en árboles de campo infectados por *V. dahliae*. Los números identifican a cada árbol. S= rama sana o ausencia de síntomas. R= rama con síntomas. S3noRT es un control negativo para comprobar la ausencia de contaminación con ADN.

5

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

10

Ejemplo 1

Detección de *Verticillium* sp. en olivo

MATERIAL Y MÉTODOS

15

1.- Análisis Transcriptómico:

1a.- Obtención de muestras.

20

Para hacer el análisis transcriptómico se utilizaron plantas cultivadas en condiciones controladas del cultivar Picual, con un grado de susceptibilidad elevado a la verticilosis y a la infección por *Phytophthora* spp. Estas plantas se sometieron a diferentes tipos de estrés, cómo heridas en las raíces, inoculación con *V. dahliae* o *P. megasperma* en plantas con heridas inducidas en las raíces, temperatura baja, estrés salino, encharcamiento de las raíces en tierra de viveros con presencia de diversos patógenos del suelo o sin tratamiento como control. Las inoculaciones con *V. dahliae* se efectuaron utilizando un aislado representativo del patotipo defoliante, que es el de mayor virulencia y el más amenazador para el olivar, además de ser el que más se está extendiendo, según los últimos trabajos e informes epidemiológicos, en diversos

25

30

países donde el olivar es relevante y, particularmente, en el área mediterránea (por ejemplo, en España y en Turquía). Se tomaron muestras de partes aéreas y de raíces de plantas sometidas a los diferentes estreses antes mencionados y con diferentes tiempos de incubación. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su utilización.

35

Para su análisis se extrajo ARN total y se realizó una secuenciación masiva mediante RNAseq de los mismos con el equipo "Illumina Hiseq 1000". La elección de la variedad Picual para realizar el estudio transcriptómico masivo inicial se debe a que es una variedad susceptible a la verticilosis.

5

También se obtuvieron muestras de plantas del cultivar Frantoio, tolerante a la verticilosis, para comparar los resultados entre resistente y sensible a la verticilosis.

1b.- Análisis bioinformático.

10

Trece muestras de tejidos de *Olea europea* L. var. Picual fueron secuenciadas por duplicado en un secuenciador Illumina HighSeq 1000, mediante paired-end sequencing y 101 pared de bases de longitud. Los 26 ficheros de secuencias fueron "trimeados" seleccionándose secuencias con una calidad media (Phred) superior a 30.

15

El total de secuencias paired-end fue de 741.674.755 (149,77 Gigabases). Cada uno de los 26 ficheros de secuencias fueron ensamblados mediante el programa informático ABySS (Ensamblaje paired-end, usando un k-mer=64). Por último, se reensamblaron todos los scaffolds obtenidos en el primer ensamblaje usando ABySS (Ensamblaje single-end, usando un k-mer=63). Al final se obtuvo un transcriptoma del olivo con 174.965 contigs y un valor de N50 para el ensamblaje de 761pb. Finalmente, el análisis transcriptómico se realizó usando el programa DNASTar QSeq. Entre estos contigs se encontró el contig_172143.

20

1c.- Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa.

25

Purificación de ARN

Las hojas congeladas en nitrógeno líquido se homogenizaron en un molino MM 400 (Resch). Se extrajo ARN total con Spectrum Plant Total RNA (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO) y se trataron con DNase I RNase free (Roche, Basel, Switzerland). Finalmente, se purificó el ARN total con RNeasy Mini Kit® (Quiagen), se cuantificó mediante espectrometría con Take3 Synergy HT spectrophotometer (Bio-Tek) y se guardó a -80°C hasta su uso.

30

Síntesis de cDNA y RT-PCR cuantitativa

“First-strand” cDNA se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total cebado con 60 µM de random hexamer primer y Transcriptor Reverse Transcriptase, usando el Transcriptor
5 First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Switzerland).

Las RT-PCR cuantitativas se realizaron en un termociclador Bio-Rad CFX96 PCR system y el master mix SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), en un volumen de reacción de 10 µl, conteniendo 10 ng de
10 cDNA. Las amplificaciones se realizaron según las siguientes condiciones: Activación inicial de la polimerasa a 98°C durante 30 s; seguido de 40 ciclos cada uno de 98°C durante 5 s (desnaturalización) y de 60°C durante 10 s (hibridación/elongación), con una etapa final de desnaturalización entre 65°C y 95°C para detener la reacción y obtener una curva de “melting”.

15

Se utilizó un control interno con un gen de actina constitutivo en el olivo con el que se normalizaron los resultados. Los cebadores para las PCRs fueron los siguientes:

contig_172143: cebador directo (172143DIS2F) AAT CTT AAG GCT GGA AGA GTC
20 CGC ATC (SEQ ID NO: 6) y cebador inverso (172143DIS2R) GCC ATA CTA TAA AAA GCT TAT TTA GAA TAG CAT CG (SEQ ID NO: 7).

Gen actina: Cebador directo (Actin40370F) CCC TTG ACT ATG AGC AGG AGC TTG
25 AGA C (SEQ ID NO: 8) y Cebador inverso (Actin40370R) GAT CAT TGA AGG CTG GTA AAG AAC CTC AG (SEQ ID NO: 9).

Cada reacción se repitió tres veces para conseguir un resultado representativo.

RESULTADOS

30

El contig_172143 se expresa en respuesta a la infección a *V. dahliae*.

El análisis bioinformático de los resultados de RNAseq permitió seleccionar un gen cuya expresión en hojas solamente se observa en plantas que han sido inoculadas
35 con *V. dahliae* (Tabla 1).

Contig	Control	Estrés				Anotación
		Frio		Heridas en las raíces	Inoculación con <i>V. dahliae</i>	
		24 h	10 días	15 días	15 días	
172143	0,75	No detectado	No detectado	0	5,12587	Blight-associated protein. Putative EG45-like domain containing protein 1 (PNP=Plant Natriuretic Peptide)

Tabla 1: La expresión del contig_172143 se produce en respuesta a la infección por *V. dahliae*. Datos de expresión en hojas. Los valores son RPKM (del inglés *Reads per kilo base per million*) y están expresados cómo log en base 2.

- 5 La secuencia de nucleótidos del ADNc del gen identificado, aquí denominado contig_172143, así como la proteína codificada por ella es la siguiente:

contig_172143 cds (SEQ ID NO: 1)

10 ATGGGCTGTCAAATTCGACTTCTTATGTTGTTTGGCACGTTGATAAGTTTTGCCTCAGTTGTAC
 TTTCTAAGCAGGGAACCTTCTGTTTACTATGCTCGACCTTATCTTCCCTCGGCATGCTATGGCAA
 CCGAAACCAAGGCATCATGATAGCAGGTGCTAATCCTACATTGTACAATGGTGGAAAAGTATGT
 GGAAGAAGGTATAAAGTTAGGTGCTTGGGAGGCACCAACAAAACACCACATCCTTGCAAAGGG
 GTGAAATAACTGTAAAAATTGTAGATCTTTGCCAGGCTGTGGAGCAAACGAGATTAATCTATC
 TCAAGATGCCTTCTCGAGGATTGCTAATCTTAAGGCTGGAAGAGTCCGCATCGACTATATCCAG
 15 GTTTGA

contig_172143 péptido (SEQ ID NO: 2)

20 MGCQIRLLMLFGTLISFASVVLKQGTSVYYARPYLPSACYGNRNQGIMIAGANPTLYNGGKVC
 GRRYKVRCLGGTNKTPHPCKRGEITVKIVDLCPGCGANEINLSQDAFSRIANLKAGRVRIDYIQ
 V*

La secuencia completa del ADNc incluyendo las regiones no codificantes UTR3' y UTR5', se muestra en la SEQ ID NO: 5

GGCCACTAGTACTTCAAACATACAGAGAATGGGCTGTCAAATTCGACTTCTTATGTTGTTTGGC
ACGTTGATAAGTTTTGCCTCAGTTGTACTTTCTAAGCAGGGAACCTTCTGTTTACTATGCTCGAC
CTTATCTTCCCTCGGCATGCTATGGCAACCGAAACCAAGGCATCATGATAGCAGGTGCTAATCC
TACATTGTACAATGGTGGAAAAGTATGTGGAAGAAGGTATAAAGTTAGGTGCTTGGGAGGCACC
 5 AACAAAACACCACATCCTTGCAAAAGGGGTGAAATAACTGTAAAAATTGTAGATCTTTGCCAG
GCTGTGGAGCAAACGAGATTAATCTATCTCAAGATGCCTTCTCGAGGATTGCTAATCTTAAGGC
TGGAAGAGTCCGCATCGACTATATCCAGGTTTGAGGCAATTTARTATGRGAAAGTAAAAAATT
TCGATGCTATTCTAAATAAGCTTTTTATAGTATGGCTCATGCAAAATATATAATCTAGCACTAG
 10 TTGAATAAGAAATTAGACAGAAATCTATTTTAGATGTTAGTCAAGAAAAATAAAAACAAGGATG
TCGTGTGAGTTTGACATATGTAGCTTTTGATATCTTCCTTATGGAAATGAAACTTTAAATTCAT
GCAAAAAAA

(las zonas no codificantes UTR5' y UTR3' se muestran subrayadas)

15 Estos resultados se confirmaron mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 1), donde puede observarse cómo se induce una respuesta a la presencia de la infección por *V. dahliae* en tan solo 7-15 días desde la inoculación con el patógeno, por lo que es un gen de respuesta suficientemente rápida cómo para servir de marcador en plantas que aún no manifiestan síntomas de verticilosis.

20

El patógeno más frecuente que infecta las raíces de los olivos y produce síntomas similares a los de la verticilosis es *P. megasperma*, necesitando de condiciones de encharcamiento continuado de las raíces que favorecen la infección del patógeno. Por este motivo se sometieron a encharcamiento varias plantas del cultivar Picual y a la
 25 mitad se le añadió un fuerte inóculo de *P. megasperma*. El análisis por RT-PCR no permitió detectar expresión en ningún caso, por lo que el contig_172143 no se induce por encharcamiento ni tampoco por *P. megasperma*.

30

Todos los ensayos se han realizado en condiciones de vivero con sustratos no esterilizados y colonizados por una importante microbiota (bacteriana y fúngica) natural, incluyendo patógenos potenciales que pueden desarrollar enfermedad bajo
 35 condiciones específicas (p.e. encharcamiento), por lo que las plantas sometidas a encharcamiento de las raíces o con heridas inducidas en las mismas suponen una aproximación a la posible infección experimental por variedad de patógenos y en ningún caso se encontró expresión del contig_172143, salvo la respuesta clara que se produce con la infección por *V. dahliae*. Por lo tanto, se puede concluir que el

contig_172143 se puede utilizar cómo marcador altamente específico y estable de la infección por *V. dahliae* en el olivo.

5 **El contig_172143 también responde a la infección por *V. dahliae* en un cultivar resistente al hongo.**

El cultivar Frantoio es altamente tolerante a *V. dahliae*, si bien puede ser infectado por el patógeno sin desarrollar un síndrome tan severo como el caso de la variedad susceptible Picual. El análisis por RT-PCR cuantitativa confirmó que se puede detectar el estado de infección en este cultivar con un nivel de tolerancia muy superior al de Picual (Figura 2).

Estos datos indican que el contig_172143 puede utilizarse cómo marcador de la verticilosis tanto en variedades susceptibles como tolerantes a *V. dahliae* y evidentemente sin síntomas de la enfermedad.

15

Uso del gen contig_172143 para detectar la infección por *V. dahliae* en árboles enfermos en el campo.

Todos los ensayos anteriores se realizaron con plantas de vivero, por lo que se quiso comprobar si el gen contig_172143 servía para detectar la verticilosis en olivos infectados en olivares en explotación.

Para ello se tomaron muestras de 7 árboles afectados procedentes de varias fincas y se analizaron muestras de hojas tomadas de la zona enferma o de ramas sin síntomas, y se observó que en las 6 muestras de ramas con síntomas (uno de los árboles no tenía en ese momento ramas afectadas) y en 6 de 7 ramas sin síntomas se expresaba el contig_172143 (Figura 3). Este último resultado demuestra que el contig_172143 no solamente es un marcador temprano de infección por *V. dahliae*, sino que es estable en su expresión a lo largo de meses o años y se puede utilizar de forma generalizada como marcador de la verticilosis en el olivo.

30

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2.
- 5
2. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 95%, en particular al menos un 98%, más en particular, al menos un 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2.
- 10
3. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 2, en el que la secuencia de aminoácidos tiene un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2.
4. Secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de nucleótidos es ARN.
- 15
5. Secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de nucleótidos es ADNc.
- 20
6. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 5, en el que el ADNc comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95%, preferiblemente, al menos un 98%, más preferiblemente al menos un 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 25
7. Secuencia de aminoácidos según la reivindicación 6, en el que el ADNc comprende una secuencia de nucleótidos que tiene un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.
8. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6 ó 7, en el que el ADNc comprende una secuencia de nucleótidos que comprende covalentemente unida a su extremo 5' la secuencia SEQ ID NO: 3 y/o operativamente unida a su extremo 3' la secuencia SEQ ID NO: 4.
- 30
9. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 8, en el que el ADNc comprende una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5.
- 35

10. Una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, operativamente unida a una secuencia reguladora de la expresión heteróloga respecto a la secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

5

11. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, o una construcción génica según la reivindicación 10.

10

12. Una célula que comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, una construcción génica según la reivindicación 10, o un vector según la reivindicación 11.

15

13. Una planta que comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, una construcción génica según la reivindicación 10, un vector según la reivindicación 11 o una célula según la reivindicación 12.

14. Una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

20

15. Secuencia de aminoácidos según la reivindicación 14, en el que dicha secuencia comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

25

16. Uso *in vitro* de una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, una construcción génica según la reivindicación 10, un vector según la reivindicación 11 o una secuencia de aminoácidos según la reivindicación 14 ó 15 como marcador de diagnóstico para la verticilosis del olivo.

30

17. Uso según la reivindicación 16, en el que la verticilosis del olivo es causada por una infección de *Verticillium* spp., en particular, por una infección de *Verticillium dahliae*.

35

18. Uso según la reivindicación 16 ó 17, en el que la secuencia de nucleótidos está sobreexpresada respecto a un valor de referencia, o la secuencia de aminoácidos está en una alta concentración respecto a un valor de referencia.

19. Un método *in vitro* para detectar la presencia de *Verticillium* spp. en un olivo que comprende:

- 5 a) determinar el nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o el nivel de la secuencia de aminoácidos según la reivindicación 14 ó 15, en una muestra biológica procedente de dicho olivo; y
b) comparar el nivel de expresión obtenida en el apartado a) con un valor de referencia.

10 20. Método según la reivindicación 19, en el que si el nivel de expresión obtenido en el apartado a) es mayor que el valor de referencia, o el nivel de la secuencia de aminoácidos es mayor que un nivel de referencia, entonces el olivo está infectado por *Verticillium* spp., en particular, *Verticillium dahliae*.

15 21. Método según la reivindicación 19 ó 20, en el que la muestra biológica procede de una hoja, del tronco, de la corteza o de la raíz del olivo.

20 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos se determina midiendo la cantidad de ARNm o ADNc.

23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que el nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos se lleva a cabo mediante northern blotting o PCR cuantitativa.

25 24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que el nivel de la secuencia de aminoácidos se lleva a cabo mediante Western blotting.

25. Un kit que comprende

- 30 - Una pareja de cebadores específicos para amplificar una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
- Una sonda de ácido nucleico diseñada de forma específica para hibridar con una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y/o
35 - Un anticuerpo específico de la proteína codificada por una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

26. Kit según la reivindicación 25, en el que la pareja de cebadores comprende un cebador directo que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6 y un cebador inverso que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.
- 5 27. Uso de un kit según la reivindicación 25 o 26 para detectar la presencia de *Verticillium* spp. en un olivo, en particular, de *Verticillium dahliae*.

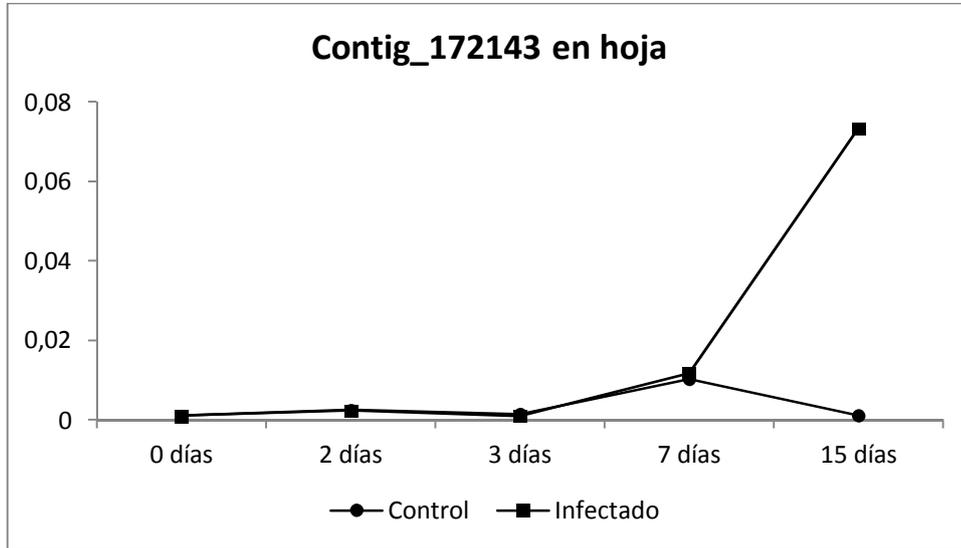


FIG. 1

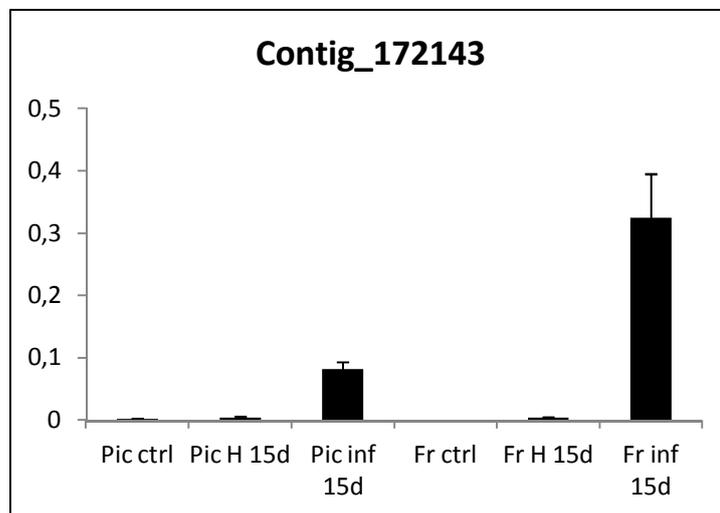


FIG. 2

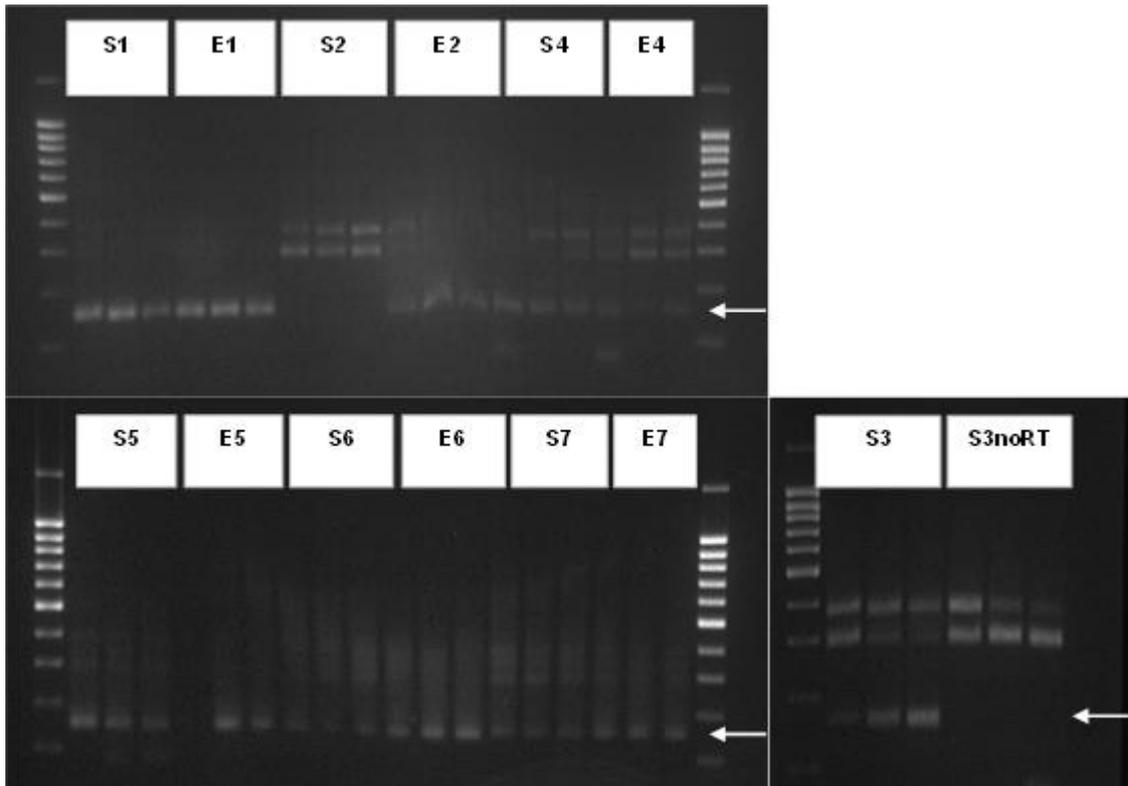


FIG. 3

ES 2 535 577 B1

LISTA SE SECUENCIAS

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

<120> Método para el diagnóstico de verticilosis en el olivo

<130> ES1881.13

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 390
<212> DNA
<213> Olea europaea

<400> 1
atgggctgtc aaattcgact tcttatgttg tttggcacgt tgataagttt tgcctcagtt 60
gtactttcta agcaggaac ttctgtttac tatgctcgac cttatcttcc ctcggcatgc 120
tatggcaacc gaaaccaagg catcatgata gcaggtgcta atcctacatt gtacaatggt 180
ggaaaagtat gtggaagaag gtataaagtt aggtgcttgg gaggcaccaa caaacacca 240
catccttgca aaaggggtga aataactgta aaaattgtag atctttgccc aggctgtgga 300
gcaaacgaga ttaatctatc tcaagatgcc ttctcgagga ttgctaactt taaggctgga 360
agagtccgca tcgactatat ccaggtttga 390

<210> 2
<211> 129
<212> PRT
<213> Olea europaea

<400> 2
Met Gly Cys Gln Ile Arg Leu Leu Met Leu Phe Gly Thr Leu Ile Ser
1 5 10 15
Phe Ala Ser Val Val Leu Ser Lys Gln Gly Thr Ser Val Tyr Tyr Ala
20 25 30
Arg Pro Tyr Leu Pro Ser Ala Cys Tyr Gly Asn Arg Asn Gln Gly Ile
35 40 45
Met Ile Ala Gly Ala Asn Pro Thr Leu Tyr Asn Gly Gly Lys Val Cys
50 55 60
Gly Arg Arg Tyr Lys Val Arg Cys Leu Gly Gly Thr Asn Lys Thr Pro
65 70 75 80
His Pro Cys Lys Arg Gly Glu Ile Thr Val Lys Ile Val Asp Leu Cys
85 90 95
Pro Gly Cys Gly Ala Asn Glu Ile Asn Leu Ser Gln Asp Ala Phe Ser
100 105 110

ES 2 535 577 B1

Arg Ile Ala Asn Leu Lys Ala Gly Arg Val Arg Ile Asp Tyr Ile Gln
 115 120 125

Val

<210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Olea europaea

<220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(28)

<400> 3
 ggccactagt acttcaaaca tacagaga 28

<210> 4
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> Olea europaea

<220>
 <221> 3'UTR
 <222> (1)..(135)

<400> 4
 ggcaatttar tatgrgaaag taaaaaatt tcgatgctat tctaaataag ctttttatag 60
 tatggctcat gcaaaatata taatctagca ctagtgtgaat aagaaattag acagaaatct 120
 atttttagatg ttagt 135

<210> 5
 <211> 649
 <212> DNA
 <213> Olea europaea

<220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(28)

<220>
 <221> CDS
 <222> (29)..(418)

<220>
 <221> 3'UTR
 <222> (419)..(649)

<400> 5
 ggccactagt acttcaaaca tacagaga atg ggc tgt caa att cga ctt ctt 52
 Met Gly Cys Gln Ile Arg Leu Leu
 1 5

atg ttg ttt ggc acg ttg ata agt ttt gcc tca gtt gta ctt tct aag 100
 Met Leu Phe Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ala Ser Val Val Leu Ser Lys
 10 15 20

cag gga act tct gtt tac tat gct cga cct tat ctt ccc tcg gca tgc 148
 Gln Gly Thr Ser Val Tyr Tyr Ala Arg Pro Tyr Leu Pro Ser Ala Cys

ES 2 535 577 B1

25		30		35		40	
tat ggc aac cga aac caa ggc atc atg ata gca ggt gct aat cct aca							196
Tyr Gly Asn Arg Asn Gln Gly Ile Met Ile Ala Gly Ala Asn Pro Thr							
		45		50		55	
ttg tac aat ggt gga aaa gta tgt gga aga agg tat aaa gtt agg tgc							244
Leu Tyr Asn Gly Gly Lys Val Cys Gly Arg Arg Tyr Lys Val Arg Cys							
		60		65		70	
ttg gga ggc acc aac aaa aca cca cat cct tgc aaa agg ggt gaa ata							292
Leu Gly Gly Thr Asn Lys Thr Pro His Pro Cys Lys Arg Gly Glu Ile							
		75		80		85	
act gta aaa att gta gat ctt tgc cca ggc tgt gga gca aac gag att							340
Thr Val Lys Ile Val Asp Leu Cys Pro Gly Cys Gly Ala Asn Glu Ile							
		90		95		100	
aat cta tct caa gat gcc ttc tcg agg att gct aat ctt aag gct gga							388
Asn Leu Ser Gln Asp Ala Phe Ser Arg Ile Ala Asn Leu Lys Ala Gly							
		105		110		115	120
aga gtc cgc atc gac tat atc cag gtt tga ggcaatttar tatgrgaaag							438
Arg Val Arg Ile Asp Tyr Ile Gln Val							
		125					
taaaaaaatt tcgatgctat tctaaataag ctttttatag tatggctcat gcaaaatata							498
taatctagca ctagttagaat aagaaattag acagaaatct attttagatg ttagtcaaga							558
aaaataaaaa caaggatgct gtgtgagttt gacatatgta gcttttgata tcttccttat							618
ggaaatgaaa ctttaaattc atgcaaaaaa a							649
<210> 6							
<211> 27							
<212> DNA							
<213> Secuencia artificial							
<220>							
<223> Cebador directo 172143DIS2F							
<400> 6							27
aatcttaagg ctggaagagt ccgcatc							
<210> 7							
<211> 35							
<212> DNA							
<213> Secuencia artificial							
<220>							
<223> Cevador inverso 172143DIS2R							
<400> 7							35
gccatactat aaaaagctta tttagaatag catcg							
<210> 8							
<211> 28							
<212> DNA							
<213> Secuencia artificial							
<220>							
<223> Cebador directo Actin40370F							
<400> 8							28
cccttgacta tgagcaggag cttgagac							

<210> 9
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso Actin40370R

<400> 9
gatcattgaa ggctggtaaa gaacctcag

29



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201331633

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.11.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CN 103333969 A (INST PLANT PROTECTION IPP CAAS) 02.10.2013, (resumen). EPODOC [en línea], [recuperado el 07.05.2015].	1-27
A	CN 103243093 A (INST CROP SCIENCE CAAS INST AGRO FOOD SCI & TECH CAAS) 14.08.2013, (resumen). EPODOC [en línea], [recuperado el 07.05.2015].	1-27
A	WO 02097131 A1 (NEWBIOTECHNIC SA et al.) 05.12.2002, reivindicaciones.	1-27
A	US 5527671 A (LI KENING et al.) 18.06.1996, reivindicaciones.	1-27

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
07.05.2015

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

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, WPI, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.05.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-27	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-27	SI
	Reivindicaciones	NO

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	CN 103333969 A (INST PLANT PROTECTION IPP CAAS)	02.10.2013
D02	CN 103243093 A (INST CROP SCIENCE CAAS INST AGRO FOOD SCI & TECH CAAS)	14.08.2013
D03	WO 02097131 A1 (NEWBIOTECHNIC SA et al.)	05.12.2002
D04	US 5527671 A (LI KENING et al.)	18.06.1996

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**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 de la LP11/1986)**

En las reivindicaciones 1-9 de la solicitud de patente se reivindica una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia SEQD ID NO:2.

En las reivindicaciones 10-13 de la solicitud de patente se reivindica una construcción génica, un vector, una célula o una planta que comprende una secuencia de nucleótidos como la mencionada anteriormente.

En las reivindicaciones 14 y 15 de la solicitud de patente se reivindica una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia objeto de la invención.

En las reivindicaciones 16-18 de la solicitud de patente se reivindica el uso *in vitro* de la citada secuencia como marcador de diagnóstico para la verticilosis del olivo.

En las reivindicaciones 19-24 de la solicitud de patente se reivindica un método *in vitro* para detectar la presencia de *Verticillium* spp. en olivo que emplea la secuencia anteriormente mencionada.

En las reivindicaciones 25-27 de la solicitud de patente se reivindica un kit que comprende una pareja de cebadores específicos para amplificar la secuencia de nucleótidos reivindicada con anterioridad, una sonda de ácido nucleico y un anticuerpo específico.

Los documentos D01, D02, D03 y D04 muestran métodos así como diferentes marcadores para la detección de *Verticillium* spp. Los marcadores genéticos reflejados en los documentos D01, D02, D03 y D04 no coinciden con las secuencias reivindicadas en la solicitud de patente y tampoco presentan altos porcentajes de identidad con ellas. Tampoco se han encontrado las secuencias reivindicadas en la solicitud de patente, en la base de datos EMBL-EBI. Por tanto, las reivindicaciones 1-27 de la solicitud de patente, presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/86.