

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 751**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2008.01)

C12Q 1/6851 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2016 PCT/EP2016/066338**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017 WO17009251**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2016 E 16739078 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3320113**

54 Título: **Procedimientos y kits para la detección del mildiú pulverulento**

30 Prioridad:

10.07.2015 EP 15290182

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2021

73 Titular/es:

**BAYER S.A.S. (100.0%)
16 rue Jean-Marie Leclair
69009 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**DUBOURNET, PATRICE;
CHERRAD, SEMCHEDDINE y
VACHER, SÉBASTIEN**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 821 751 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y kits para la detección del mildiú pulverulento

La presente invención se refiere a procedimientos y kits para la detección del agente causante del mildiú pulverulento en la uva, el hongo *Erysiphe necator*. Más específicamente, los procedimientos de acuerdo con la invención son procedimientos cuantitativos basados en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

Antecedentes

El mildiú pulverulento de la vid provocado por *Erysiphe necator* (también conocido como *Uncinula necator*) es una de las enfermedades más extendidas de la vid (*Vitis vinifera* L.) en todo el mundo. *Erysiphe necator* pertenece a los ascomicetos y es un hongo biotrófico obligado, es decir, su crecimiento y reproducción dependen totalmente de su hospedador de vid vivo (uvas y hojas). Como consecuencia, el mildiú pulverulento de la vid no puede cultivarse *in vitro*, es difícil de criopreservar y aún no se ha establecido un protocolo de transformación confiable, planteando serios desafíos para su uso experimental en laboratorios (Spanu y col., 2012, New Phytologist 195: 20-22).

A pesar de su importancia, la caracterización molecular de los mildiús de los viñedos y la información de las bases de datos genéticas siguen siendo deficientes. Aparte de *Blumeria graminis*, solo se han depositado 23 etiquetas de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés) en GenBank para Erysiphales (National Center for Biotechnology Information, 2009). Un factor importante que contribuye a esta ausencia de datos de expresión para el mildiú pulverulento es la dificultad para aislar y mantener el hongo en cultivo de laboratorio *in vitro* (Cadle-Davidson y col., 2010, J. Phytopathol. 158: 69-71). No obstante, trabajos recientes en la secuenciación del genoma del hongo *E. necator* proporcionaron información de genes putativos y la investigación del NCBI hoy da más de 500 EST.

En viñedos, el seguimiento de los síntomas de la enfermedad es un componente crucial de un enfoque integrado de la gestión de viñedos y la producción de uvas libres de enfermedades. Sin embargo, la evaluación visual del mildiú pulverulento es altamente subjetiva, particularmente cuando la infección de las hojas es leve.

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de PCR cuantitativa molecular para mejorar la gestión de la infección por mildiú pulverulento en el campo, preferentemente para la detección temprana del ADN de *Erysiphe necator* en hojas de vid antes de la aparición de síntomas visuales. Dicho procedimiento de diagnóstico molecular puede ser una herramienta muy útil en la gestión y la planificación de tratamientos fungicidas.

Se han realizado intentos anteriores para intentar detectar *Erysiphe necator* por qPCR, en particular para detectar y monitorizar poblaciones resistentes, por ejemplo, diseñando cebadores de qPCR dirigidos al gen CYP51 (Dufour y col., 2011, Pest Manag Sci 67: 60-69; Jones y col., 2014, BMC Genomics 15:1081).

Descripción de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona procedimientos y medios para detectar o ensayar la presencia del hongo *Erysiphe necator* en muestras, en particular en muestras de vid, y más particularmente para medir cuantitativamente el nivel de presencia del hongo *Erysiphe necator* en la vid. Una ventaja de la invención radica en la sensibilidad del procedimiento, posiblemente permitiendo la detección del hongo antes de que cualquier síntoma sea visible en las plantas.

El procedimiento desvelado en el presente documento hace uso de la tecnología cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), también conocida como qPCR o PCR en tiempo real. La PCR es la tecnología que permite la rápida amplificación de secuencias de ADN diana usando oligonucleótidos específicos como cebadores de reacciones de amplificación que tienen lugar en ciclos repetidos. Esta tecnología es bien conocida y entendida por el experto en la materia. La PCR clásica permite la detección cualitativa de determinadas secuencias de ADN diana, mientras que la qPCR permite una medida cuantitativa de la cantidad de secuencia de ADN diana.

Como la PCR clásica, la qPCR requiere un conjunto de dos oligonucleótidos que se utilizan como cebadores de la reacción de amplificación. Los cebadores son específicos de la secuencia de ADN diana que se va a amplificar, es decir, consisten en fragmentos cortos de ácido nucleico correspondientes a porciones de la secuencia de ADN diana, preferentemente porciones que flanquean inmediatamente la secuencia de ADN diana. Un cebador es el cebador directo y el otro es el cebador inverso, cada uno coincidiendo con, es decir, siendo idéntico en secuencia a, una parte de la secuencia de ADN que flanquea la secuencia de ADN diana y de esta manera definiendo la secuencia de ADN diana que se va a amplificar, que es la secuencia de ADN ubicada entre (aunque incluyendo) los dos cebadores. El cebador directo es el oligonucleótido que coincide con la cadena con sentido de la parte de la secuencia de ADN en un extremo de la secuencia de ADN diana, y el cebador inverso es el oligonucleótido que coincide con la cadena complementaria (antisentido) de la parte de la secuencia de ADN en el otro extremo de la secuencia de ADN diana. Durante cada ciclo de la PCR, la secuencia de ADN que contiene la secuencia de ADN diana se desnatura (desaparea) a altas temperaturas (aproximadamente 95 °C) generando de esta manera ADN monocatenario con el que los cebadores pueden hibridar en una etapa siguiente de temperaturas más bajas (aproximadamente 65 °C), permitiendo después que las ADN polimerasas tolerantes al calor extiendan la síntesis de la secuencia de ADN diana

desde cada cebador. La repetición de este ciclo térmico (aproximadamente 30 veces) permite la generación de miles de copias de la secuencia de ADN diana, que después puede identificarse, por ejemplo, en una electroforesis en gel de agarosa.

5 La qPCR también se denomina PCR en tiempo real o cuantitativa porque, además de la PCR clásica, la reacción también incorpora compuestos indicadores fluorescentes, permitiendo la detección y medición de la cantidad de ADN diana formado en cada ciclo. Los compuestos indicadores fluorescentes pueden ser específicos de la secuencia de ADN diana amplificada por PCR (sonda de oligonucleótidos específica a la que se enlaza un indicador fluorescente, junto con un inactivador) o inespecíficos (tinte fluorescente que se une al ADN bicatenario, como, por ejemplo, el tinte SYBR Green). La comparación adicional de la fluorescencia medida con las referencias apropiadas permite la
10 cuantificación precisa de la cantidad inicial de ADN diana, por ejemplo, en una muestra.

El elemento importante en qPCR para ensayar la presencia y cantidad de un patógeno dado en una muestra determinada, por ejemplo, una planta o muestra de suelo, es la identificación preliminar de un par de cebadores que son específicos del patógeno que se va a ensayar. Los cebadores específicos para un patógeno dado son cebadores que permiten la amplificación de una secuencia de ADN diana que es específica del patógeno, es decir, que solo está
15 presente en el patógeno de interés y no, o no exactamente, en, por ejemplo, una especie de patógeno diferente.

De acuerdo con la presente invención, los cebadores son específicos del hongo *Erysiphe necator*, es decir, permiten la amplificación de una parte del ADN de esta especie fúngica que solo está presente en esta especie fúngica y no en otras especies, incluso estrechamente relacionadas. Solo con cebadores específicos el procedimiento qPCR puede ser capaz de discriminar entre todas las secuencias de ADN de diversos organismos que podrían estar presentes, por
20 ejemplo, en una muestra de hoja o suelo.

De acuerdo con una realización específica, la invención por lo tanto proporciona cebadores de oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en los oligonucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 y cebadores de oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en los oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.

25 Las realizaciones preferidas de la invención son cebadores de oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en los oligonucleótidos que tienen la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1; u oligonucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.

Un oligonucleótido es una molécula corta de ADN, generalmente compuesta por al menos 10 nucleótidos y hasta 30 nucleótidos. Un oligonucleótido óptimo, para su uso como cebador de PCR o como sonda, generalmente está compuesto por 18 a 24 nucleótidos, pero pueden usarse oligonucleótidos más cortos o más largos, y el experto en la materia sabe qué parámetros considerar para seleccionar oligonucleótidos de longitud apropiada para un fin dado. Un oligonucleótido de acuerdo con la divulgación está compuesto preferentemente por 19 a 21 nucleótidos.

La invención por lo tanto también abarca cebadores de oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de los oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o al menos 10 nucleótidos contiguos de los oligonucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos complementaria a las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, con la excepción del oligonucleótido específico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2.

Los nucleótidos contiguos se refieren a una serie de nucleótidos de una molécula de ADN o un oligonucleótido que son consecutivos entre sí en la secuencia de nucleótidos de tal molécula de ADN u oligonucleótido.

40 De acuerdo con determinadas realizaciones alternativas, los cebadores de oligonucleótidos tienen una longitud de al menos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos contiguos. Más específicamente, los cebadores de oligonucleótidos tienen una longitud de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos contiguos.

45 Como se usa en el presente documento, las secuencias de nucleótidos "complementarias" se refieren a dos secuencias de nucleótidos cuyas bases de nucleótidos son complementarias en una determinada parte contigua de sus respectivas secuencias de acuerdo con las reglas de complementariedad convencionales de Watson y Crick y, por lo tanto, son capaces de emparejarse o hibridar entre sí en sus respectivas partes complementarias. Específicamente, las bases de purina se aparean con bases de pirimidinas, y más específicamente una base de guanina aparea con una base de citosina (G:C) y una base de adenina aparea con una base de timina (A:T) en el caso del ADN, o con una base de uracilo (A:U) en el caso de ARN.

Un cebador oligonucleotídico es un oligonucleótido que se usa como cebador en un procedimiento de amplificación por PCR (una qPCR en el contexto de la presente invención). En consecuencia, un cebador oligonucleotídico es un oligonucleótido que coincide con, es decir, idéntico en secuencia a, una porción de un ADN diana que se pretende amplificar en el procedimiento de PCR. Cuando se ejecuta el procedimiento de PCR de modo que las dos cadenas del ADN diana se desaparean, el cebador oligonucleotídico se une a la parte del ADN diana a la que es complementario en secuencia. Una vez que se une el cebador oligonucleotídico, puede usarse después como punto de partida para que una ADN polimerasa inicie la amplificación del ADN diana.

Los cebadores oligonucleotídicos de la invención son específicos de una parte del ADN del genoma del hongo *Erysiphe necator*. Más específicamente, estos cebadores de oligonucleótidos son específicos de los Espaciadores Transcritos Internos (ITS, por sus siglas en inglés) ribosómicos nucleares de *Erysiphe necator*. Los ITS son dos regiones de ADN no codificante (denominadas ITS1 e ITS2) presentes en todos los eucariotas y ubicadas entre los dos genes que codifican el ARN ribosómico de subunidad pequeña (18S) y el ARN ribosómico de subunidad grande (25S o 28S), de forma más específica, respectivamente, entre el gen que codifica el ARN ribosómico de subunidad pequeña (18S) y el que codifica el ARN ribosómico 5,8S para ITS1, y entre el gen que codifica el ARN ribosómico 5,8S y el que codifica el ARN ribosómico y la subunidad grande (25S o 28S) para ITS2.

Cualquier procedimiento de amplificación por PCR, incluyendo qPCR, usa al menos dos cebadores oligonucleotídicos, habitualmente denominados un par de cebadores oligonucleotídicos. Un par de cebadores oligonucleotídicos consiste en un cebador oligonucleotídico denominado cebador oligonucleotídico directo y un cebador oligonucleotídico denominado cebador oligonucleotídico inverso. Los cebadores oligonucleotídicos directo e inverso están ubicados respectivamente en cada extremo del ADN diana que se amplificará en el procedimiento de PCR. El cebador oligonucleotídico directo es idéntico en secuencia a la parte de la cadena sentido correspondiente a su extremo del ADN diana y, por lo tanto, se une a la cadena complementaria (es decir, antisentido) del ADN diana durante el procedimiento de PCR, mientras que el cebador oligonucleotídico inverso es idéntico en secuencia a la parte de la cadena antisentido correspondiente a su extremo del ADN diana (en el otro extremo del ADN diana) y, por lo tanto, se une a la cadena complementaria (es decir, sentido) del ADN diana durante el procedimiento de PCR. Un par de cebadores oligonucleotídicos consiste por lo tanto en dos cebadores oligonucleotídicos, un cebador oligonucleotídico directo y un cebador oligonucleotídico inverso, definiendo juntos, y necesarios para, un ADN diana que se amplificará en un procedimiento de PCR.

Preferentemente, la invención de esta manera proporciona un par de cebadores oligonucleotídicos seleccionados del grupo que consiste en (i) el par de oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 para el cebador oligonucleotídico directo y SEQ ID NO: 2 para el cebador oligonucleotídico inverso, y (ii) el par de oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos complementarias a las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 para el cebador oligonucleotídico inverso y SEQ ID NO: 2 para el cebador oligonucleotídico directo.

La invención también abarca los pares de oligonucleótidos que consisten en oligonucleótidos que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de nucleótidos de los oligonucleótidos anteriores.

Un par preferido de cebadores oligonucleotídicos para llevar a cabo la invención es el par de oligonucleótidos que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 para el cebador oligonucleotídico directo y SEQ ID NO: 2 para el cebador oligonucleotídico inverso; o alternativamente el par de oligonucleótidos que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos complementarios a las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 para el cebador oligonucleotídico inverso y SEQ ID NO: 2 para el cebador oligonucleotídico directo.

Preferentemente, el par de cebadores oligonucleotídicos consiste en oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 para el cebador oligonucleotídico directo y SEQ ID NO: 2 para el cebador oligonucleotídico inverso; o alternativamente los oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos complementarias a SEQ ID NO: 1 para el cebador oligonucleotídico inverso y SEQ ID NO: 2 para el cebador oligonucleotídico directo

El uso de pares de cebadores oligonucleotídicos permite la amplificación específica de la región ITS del hongo *Erysiphe necator* en qPCR.

La invención también proporciona oligonucleótidos que se usarán como sondas para detectar y medir específicamente la cantidad de ADN diana amplificado durante el procedimiento de qPCR. Las sondas oligonucleotídicas para su uso como sonda para llevar a cabo una qPCR de acuerdo con la invención es el oligonucleótido que comprende al menos 10 y hasta 30 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6. Como alternativa, un oligonucleótido preferido para su uso como sonda para llevar a cabo una qPCR de acuerdo con la invención es el oligonucleótido que comprende al menos 10 y hasta 30 nucleótidos contiguos complementarios a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6.

Los oligonucleótidos usados como sondas que se diseñan basándose en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6 deben usarse con el par de oligonucleótidos usados como cebadores que se diseñan basándose en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y 2. Esta combinación de cebadores oligonucleotídicos y sonda se prefiere para llevar a cabo una qPCR de acuerdo con la invención.

Los oligonucleótidos proporcionados en la presente divulgación usados como cebador o como sonda, tienen una longitud de al menos 10 nucleótidos contiguos. De acuerdo con determinadas realizaciones alternativas, los oligonucleótidos tienen una longitud de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. Preferentemente, los oligonucleótidos de la invención tienen una longitud de 19 a 21 nucleótidos.

También se desvela un procedimiento para la detección específica del hongo *Erysiphe necator*, que comprende:

- (a) someter una muestra a reacción en cadena (de la polimerasa cuantitativa (qPCR) usando un par de cebadores oligonucleotídicos de la invención; y

(b) determinar la presencia o ausencia, de *Erysiphe necator* en la muestra visualizando, o no, el ADN diana amplificado por la qPCR.

La "detección específica" significa que el procedimiento tiene como objeto detectar específicamente el hongo *Erysiphe necator* y ningún otro organismo vivo, en muestras que también pueden contener otros organismos vivos. Al menos, el procedimiento tiene como objeto no detectar ningún organismo vivo que pueda estar presente en una muestra recogida en lugares susceptibles de contener *Erysiphe necator*, es decir, muestras recolectadas en o alrededor de especies de plantas del género *Vitis*, más particularmente *Vitis vinifera*.

Una "muestra" se refiere preferentemente a una pequeña cantidad de material recolectado en lugares en los que *Erysiphe necator* es susceptible de estar presente, pero, en principio, puede recogerse en cualquier lugar. Ya que *Erysiphe necator* tiene especies del género *Vitis* como sus plantas hospedadoras preferidas, un lugar preferido en el que este hongo es susceptible de estar presente es en especies de plantas del género *Vitis* o un lugar en el que crezcan tales especies de plantas, por ejemplo, el suelo circundante. Dado que una de esas especies de plantas hospedadoras de *Erysiphe necator* es el viñedo ampliamente cultivado *Vitis vinifera*, un lugar preferido en el que el hongo es susceptible de estar presente es en plantas de la especie *Vitis vinifera*, por ejemplo, en hojas, uvas, tronco (o brazos) o tallos (sarmientos), o un lugar en el que crezcan tales especies de plantas, por ejemplo, el suelo circundante. Una muestra preferida de acuerdo con la invención es por lo tanto una pequeña cantidad de hojas (tales como, por ejemplo, un disco foliar cortado de una hoja entera) o una uva de plantas de la especie *Vitis vinifera* o una pequeña cantidad de suelo que rodea el lugar en el que las plantas de la especie *Vitis vinifera* están creciendo. También puede recogerse una muestra de acuerdo con la invención de la superficie superior o inferior de las hojas, de la superficie de las uvas, del tronco (o brazos) o de los tallos (sarmientos), es decir, sin recoger material vegetal, por los medios apropiados conocidos por el experto en la materia.

Para que la qPCR posiblemente amplifique cualquier ADN diana presente en la muestra, el ADN de cualquier materia viva presente en la muestra, incluyendo esporas de *Erysiphe necator* o cualquier otra estructura biológica, necesita ser de libre acceso a los diferentes elementos de la qPCR (es decir, cebadores, ADN polimerasa, indicadores fluorescentes). En consecuencia, la muestra sometida a qPCR puede usarse como tal, o puede someterse previamente a una etapa de extracción de ADN. Cuando se realiza una extracción de ADN previa en la muestra, el experto en la materia puede usar cualquier procedimiento de extracción de ADN conocido en la técnica.

También se desvela un procedimiento para la cuantificación específica del hongo *Erysiphe necator*, que comprende:

- (a) someter una muestra a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) usando un par de cebadores oligonucleotídicos de la invención; y
- (b) determinar la cantidad de *Erysiphe necator* en la muestra comparando la cantidad medida de ADN diana amplificado por qPCR con los datos de amplificación del ADN de referencia.

La "cuantificación específica" significa que el procedimiento tiene como objeto cuantificar específicamente la cantidad del hongo *Erysiphe necator* y ningún otro organismo vivo, presente en muestras que también pueden contener otros organismos vivos.

La cantidad de *Erysiphe necator* presente en la muestra se determina primero midiendo la cantidad de ADN diana amplificado por la qPCR y después comparando dicha cantidad medida de ADN diana amplificado por la qPCR con algunos datos de amplificación de ADN de referencia. Los "datos de amplificación del ADN de referencia" consisten en datos patrón correspondientes a medidas predeterminadas de las cantidades de ADN diana amplificadas por la qPCR, después de un número definido de ciclos de amplificación, a partir de cantidades iniciales conocidas de ADN diana. Basado en dichos datos de amplificación de ADN de referencia, es posible inferir de la cantidad medida de ADN diana amplificado por la qPCR en una muestra, qué cantidad de dicho ADN diana (por lo tanto, del hongo *Erysiphe necator*) estaba presente en la muestra antes del procedimiento de amplificación de qPCR.

La determinación y medición del ADN diana durante el procedimiento de qPCR se realiza con las sondas de oligonucleótidos desveladas en el presente documento o con cualquier indicador como se describe en lo sucesivo en el presente documento.

También se desvela un kit de diagnóstico utilizado para detectar el hongo *Erysiphe necator*, con lo que el kit comprende al menos uno de los cebadores oligonucleotídicos seleccionados del grupo que consiste en los oligonucleótidos que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 y los oligonucleótidos que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos complementarios a los de SEQ ID NO: 1.

Preferentemente, el kit de diagnóstico usado para detectar el hongo *Erysiphe necator* comprende el par de cebadores oligonucleotídicos que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 para el cebador oligonucleotídico directo y SEQ ID NO: 2 para el cebador oligonucleotídico inverso; o alternativamente el par de cebadores oligonucleotídicos que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos complementarios a las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 para el cebador oligonucleotídico inverso y SEQ ID NO: 2 para el cebador oligonucleotídico directo.

De acuerdo con una realización específica, el kit de diagnóstico comprende el par de cebadores oligonucleotídicos

que consiste en oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 para el cebador oligonucleotídico directo y SEQ ID NO: 2 para el cebador oligonucleotídico inverso; o alternativamente los oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos complementarias a SEQ ID NO: 1 para el cebador oligonucleotídico inverso y SEQ ID NO: 2 para el cebador oligonucleotídico directo.

- 5 Además de los cebadores oligonucleotídicos, el kit también contiene un indicador, preferentemente un reportero fluorescente. Un indicador es un compuesto que se une al ADN amplificado durante la qPCR, permitiendo así la medición de la cantidad de ADN amplificado. Un indicador fluorescente es un compuesto, por ejemplo, un fluoróforo, que emite una luz fluorescente específica cuando se excita por una luz en una longitud de onda específica del compuesto.
- 10 Para el fin del kit y los procedimientos desvelados en el presente documento, el indicador puede ser un colorante no específico que se intercala en moléculas de ADN bicatenario. Estos colorantes aumentan su señal fluorescente cuando se unen a un ácido nucleico bicatenario y pueden detectarse mediante un sistema de detección de fluorescencia convencional. Cualquier colorante intercalador de ADN conocido por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, bromuro de etidio o SYBR Green pueden ser adecuados para llevar a cabo la invención. Un tinte fluorescente que intercala el ADN no específico preferido para llevar a cabo la invención es el tinte SYBR Green, también conocido con su nombre IUPAC como N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-iliden)metil]-1-fenilquinolin-1-io-2-il]-N-propilpropan-1,3-diamina.

- Alternativamente a un colorante intercalador de ADN no específico, el indicador fluorescente del kit puede ser una sonda fluorescente específica de secuencia. Una sonda tal es un oligonucleótido marcado con un fluoróforo. Cuando se usa para fines de qPCR, tales sondas oligonucleotídicas marcadas tienen una secuencia complementaria de al menos 10 nucleótidos contiguos de la secuencia diana que se amplifica por la qPCR.

- Una sonda preferida para llevar a cabo el procedimiento reivindicado es una sonda marcada de acuerdo con el sistema TaqMan. El sistema TaqMan es una tecnología disponible del fabricante Life Technologies Inc. De acuerdo con el sistema TaqMan, la sonda oligonucleotídica diseñada específicamente para hibridar con el ADN diana amplificado está unida covalentemente con un fluoróforo en su extremo 5' y con un inactivador en su extremo 3'. Algunos ejemplos de fluoróforos adecuados para su uso en el sistema TaqMan incluyen 6 carboxi-fluoresceína (FAM) o tetraclorofluoresceína (TET). Un inactivador típico es la tetrametilrodamina (TAMRA). El principio de este sistema TaqMan es que el inactivador inhibe la fluorescencia del fluoróforo siempre que ambos estén en estrecha proximidad de la sonda. Una vez que la sonda oligonucleotídica se hibrida con el ADN diana durante el procedimiento de amplificación de qPCR, se degrada por la Taq polimerasa a medida que esta enzima alarga los cebadores oligonucleotídicos a lo largo del ADN correspondiente al ADN diana. Esta degradación libera el fluoróforo y el inactivador, que ya no está en estrecha proximidad del fluoróforo, permitiendo de esta manera que el fluoróforo emita su fluorescencia, que después puede detectarse y medirse por medios apropiados generalmente integrados en dispositivos qPCR (es decir, termocicladores).

- 35 Una sonda oligonucleotídica preferida para su uso en el kit para marcar con el sistema TaqMan o con cualquier otro sistema conocido por ser adecuado para el experto en la materia, es un oligonucleótido seleccionado entre los oligonucleótidos que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 6 y los oligonucleótidos que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias complementarias a las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 6.

- 40 Un oligonucleótido preferido para su uso como sonda para llevar a cabo una qPCR de acuerdo con el procedimiento reivindicado es el oligonucleótido que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6. Como alternativa, un oligonucleótido preferido para su uso como sonda para llevar a cabo una qPCR de acuerdo con el procedimiento reivindicado es el oligonucleótido que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos complementarios a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6.

- 45 Los oligonucleótidos usados como sondas en el kit, que se diseñan basándose en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6 deben usarse con el par de oligonucleótidos usados como cebadores que se diseñan basándose en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y 2. Se prefiere usar esta combinación de cebadores oligonucleotídicos y sonda en el kit y para realizar una qPCR de acuerdo con el procedimiento reivindicado.

- Los oligonucleótidos proporcionados para el kit tienen preferentemente una longitud de al menos 10 nucleótidos contiguos. De acuerdo con determinadas realizaciones alternativas, los oligonucleótidos tienen una longitud de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleótidos.

- El kit puede incluir además elementos, tales como reactivos, necesarios para llevar a cabo la qPCR, como es sabido por el experto en la materia. Además del par de cebadores y una sonda, el kit puede comprender una o más enzimas (polimerasa Taq) o reactivos que se utilizarán en las reacciones de qPCR. Las enzimas pueden estar presentes en forma liofilizada o en tampones apropiados. Adicionalmente, el kit puede contener todos los elementos adicionales necesarios para llevar a cabo una qPCR, tales como tampones, reactivos de extracción, enzimas, pipetas, placas, ácidos nucleicos, trifosfatos de nucleósidos, papel de filtro, materiales de gel, materiales de transferencia, suministros de autorradiografía, instrucciones y similares.

Listado de secuencias:**SEQ ID NO: 1: cebador ITS-F****SEQ ID NO: 2: cebador ITS-R****SEQ ID NO: 6: ITS-Fsonda**

- 5 Los diversos aspectos de la invención se entenderán más completamente por medio de los ejemplos experimentales a continuación.

10 Todos los procedimientos o funciones descritos a continuación se dan a modo de ejemplo y corresponden a una elección, realizada entre los diversos procedimientos disponibles para lograr el mismo resultado. Esta elección no tiene ningún efecto sobre la calidad del resultado y, como consecuencia, cualquier procedimiento adecuado puede usarse por aquellos expertos en la materia para lograr el mismo resultado. En particular, y a menos que se especifique lo contrario en los ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante empleadas se llevan a cabo de acuerdo con los protocolos convencionales descritos en Sambrook y Russel (2001, Molecular cloning: A laboratory manual, Tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) en Ausubel y col. (1994, Current Protocols in Molecular Biology, Current protocols, EE.UU., Volúmenes 1 y 2) y en Brown (1998, Molecular Biology LabFax, Segunda edición, Academic Press, RU). Los materiales y procedimientos convencionales para biología molecular vegetal se describen en Croy R.D.D. (1993, Plant Molecular Biology LabFax, BIOS Scientific Publications Ltd (RU) y Blackwell Scientific Publications (RU)). Los materiales y procedimientos convencionales para la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) también se describen en Dieffenbach y Dveksler (1995, PCR Primer: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) y en McPherson y col. (2000, PCR - Basics: From background to bench, Primera edición, Springer Verlag, Alemania).

Ejemplos**Ejemplo 1: Diseño de cebadores específicos para *Erysiphe necator***

25 Se usaron diversos aislados de mildiú pulverulento para desarrollar el procedimiento qPCR. Se purificaron y se mantuvieron en hojas desprendidas de *Vitis vinifera* cv. Cinsaut. Las inoculaciones de bioensayo se produjeron con esporas sopladas de hojas esporulantes de 12-14 días sobre la superficie superior de las hojas desinfectadas mediante una bomba de aire en una torre de sedimentación de plexiglás. Las hojas infectadas se incubaron a 22 °C en una cámara de crecimiento (fotoperiodo de 12/12 h luz/oscuridad) y se transfirieron a medio de agar fresco cada 3 a 4 días. El material fúngico que crece en las superficies de las hojas se raspó en tubos Eppendorf y los discos foliares contaminados se congelaron a -20 °C.

30 El ADN se extrajo de aislados de hongos *Erysiphe necator* de acuerdo con el kit plantil NucleoSpin® (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos de ADN se almacenaron a -20 °C.

35 La región ITS región de tres aislados de *Erysiphe necator* de laboratorios se amplificaron por PCR y se secuenciaron usando cebadores ITS1 e ITS4 (White, TJ y col. (1990), PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications 18, 315-322). Todas las amplificaciones por PCR se realizaron en 25 µl de mezcla de reacción incluyendo 10 µl de Mezcla GoTaq (Promega, Francia), 400 pmol de cada cebador y 30 ng de plantilla de ADN. El ciclo de PCR se programó en un termociclador Eppendorf de la siguiente manera: 94 °C durante 10 min y después 30 ciclos a 94 °C durante 1 min, 58 °C temperatura de hibridación durante 1 min, 72 °C durante 1 min, después de una extensión final de 72 °C durante 10 min. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis (TBE 0,5X) en gel de agarosa al 1,5 %, se detectaron con SYBR® Safe y se fotografiaron bajo luz UV.

40 Los productos de PCR amplificados de ITS se secuenciaron para los tres aislados de *Erysiphe necator* probados. Las secuencias obtenidas se compararon mediante software de alineación con las secuencias publicadas en la base de datos NCBI (n.º de registro de GenBank AF049332.1 y AF011325.1).

45 Múltiples secuencias de espaciador transcrito interno amplificadas a partir de diferentes aislados de hongos *E. necator* están disponibles en la base de datos. La amplificación por PCR con los cebadores ITS1 e ITS4 de la región ITS en ADN extraído de aislados de micelio puro o en ADN de discos foliares necróticos totales da el mismo resultado. Se obtuvo una secuencia de aproximadamente 600 nucleótidos a partir de los tres aislados analizados (Anexo 1). El análisis de esta secuencia con el software de alineación de secuencias múltiples ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) muestra similitudes entre las secuencias publicadas y la secuencia de los tres aislamientos probados en laboratorio.

50 Los cebadores se diseñaron para el desarrollo de qPCR en regiones conservadas y alineadas entre los diferentes aislados. Los conjuntos de sonda y cebador diseñados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: cebadores y sondas probados para qPCR de *E. necator*

Conjunto-I: Tamaño del amplicón = 67		Tm
ITS_A-F	5'-GTGGCCCTTAAAGACAGTGG-3'	59,59
ITS_A-R	5'-CTGTGCGGAGGAACAAGTTA-3'	59,07
ITS_A-Rsonda	5'FAM-CTACGCGTAGAGCCCACGCG-3'TAMRA	68,38
Conjunto-IA: Tamaño del amplicón = 72		
ITS_A-F	5'-GTGGCCCTTAAAGACAGTGG-3'	59,59
ITS_A-R1	5'-TCACTCTGTGCGGAGGAAC-3'	59,42
ITS_A-Rsonda	5'FAM-CTACGCGTAGAGCCCACGCG-3'TAMRA	68,38
Conjunto-II: Tamaño del amplicón = 97		
ITS-F	5'-GACAGAGTGACGCTCGTGAT-3'	59,00
ITS-R	5'-TTCAGCGGGTATTCTACCT-3'	58,67
ITS-Fsonda	5'FAM-CACCTTTGTCCGGTCATCCGG-3'TAMRA	69,02

Todas las qPCR realizadas contenían un cebador directo, un cebador inverso y una sonda que usa 6-carboxifluoresceína (FAM) como fluoróforo indicador en el extremo 5', con N,N,N,N-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA) como inactivador en el extremo 3' (Tabla 1) o un indicador no específico (por ejemplo, SYBR Green). La mezcla maestra concentrada dos veces de qPCR (Platinum MasterMix SybrGreen-Invitrogen y sonda MasterMix-Roche), 300 nM de sonda y 300 nM de cada cebador se combinaron en agua estéril, libre de nucleasas (Invitrogen) antes de la adición de cualquier plantilla de ADN. El vial que contenía la mezcla maestra se agitó con vórtex para asegurar la homogeneidad de la solución y se centrifugó brevemente en una microcentrífuga. Se dispensaron alícuotas (15 µl) de la mezcla de reacción a cada capilar de vidrio de 20 µl (Roche, Francia). Se probaron dos sistemas indicadores, el ensayo de SYBR Green intercalante y el sistema de sonda TaqMan.

Se añadió plantilla de ADN (5 µl) a cada reacción y los capilares se sellaron con una tapa de plástico. El LightCycler 2.0 Sample Carousel se centrifugó antes del análisis de qPCR. Se probaron tres conjuntos de cebadores o cebadores/sonda en el sistema capilar LightCycler (Roche applied science) con diferentes programas de ejecución (Tabla 1). Todos los ensayos fueron idénticos en las concentraciones de sonda y cebador. Sólo se seleccionó el conjunto de cebadores y el programa correspondiente dando alta eficiencia de qPCR (90 a 100 %) y amplificación específica para experimentos *in vivo*.

La curva patrón se generó a partir de la amplificación del gen diana (ADN-plásmido) presente en un intervalo de concentraciones de plantilla iniciales y después se determinan los valores Ct para cada concentración de plantilla. Posteriormente, se traza una regresión lineal simple de estos valores de Ct frente al logaritmo del número de copias del gen inicial. Para cada experimento, la eficiencia de amplificación (E), el coeficiente de regresión lineal (r²) y especialmente el valor de la intersección con el eje y describe la curva patrón e indica la sensibilidad de la reacción. La pendiente de la curva patrón da la eficiencia de la reacción de PCR mediante las siguientes ecuaciones: Eficiencia = 10(-1/pendiente) - 1.

Eficiencia y especificidad de qPCR

Para seleccionar el mejor conjunto de cebadores enumerados en la Tabla 1, el ADN plasmídico que contiene la secuencia de la región ITS de *E. necator* se diluyó en serie en proporciones 1:10. Los números de copias de las secuencias ITS clonadas derivaron del peso molecular del vector de clonación y del inserto. El análisis de qPCR se realizó en concentraciones de plásmido usando los diferentes conjuntos de cebadores con SYBRGreen o cebadores acoplados a un sistema de sonda de hidrólisis TaqMan adicional. Un marcador característico de los ensayos de alta calidad es la eficiencia de la amplificación por PCR. La evaluación de la eficiencia es esencial para cada procedimiento de cuantificación de genes qPCR. La eficacia de amplificación de qPCR óptima se obtuvo con los cebadores ITS-Directo (5'-GACAGAGTGACGCTCGTGAT-3 ') e ITS-Inverso (5'-TTCAGCGGGTATTCTACCT-3') (Conjunto-II) con SYBRGreen como fluoróforo. La cuantificación se realizó utilizando los siguientes parámetros de amplificación: precalentamiento inicial a 95 °C durante 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 60 s, extensión a 72 °C durante 20 s. Un análisis adicional de la curva de fusión implicó una pre-fusión de 15 s a 95 °C seguido de una rampa de temperatura de 60 °C a 95 °C, con una retención de 15 s en cada etapa de 0,1 °C de la rampa. La adquisición y el análisis de datos se adquirieron de acuerdo con el procedimiento del máximo de la segunda derivada.

La eficiencia calculada del análisis de qPCR con este conjunto de cebadores (Conjunto II) es cercana al 100 %, mientras que otros cebadores probados muestran una baja eficiencia y un descarte de ΔC_p más alto entre una dilución y la siguiente. La detección SYBR Green brinda más sensibilidad que el sistema de sonda TaqMan y los presentes inventores observaron una diferencia de 3 ciclos entre los dos sistemas probados para la misma concentración más alta de ADN de plásmido ($1,2 \times 10^6$ copias del gen). La repetición de las ejecuciones de la curva patrón de ADN de plásmido con el programa y el conjunto de cebadores seleccionados revelan la estabilidad y solidez del ensayo de qPCR.

Como SYBR Green no es específico y se une a cualquier ADN bicatenario, es esencial usar pares de cebadores que sean altamente específicos para su secuencia diana. Para garantizar que el procedimiento qPCR desarrollado con estos cebadores sea altamente específico para el gen diana de *E. necator*, se probó el ADN genómico de otros hongos. 100 ng de ADN extraído del micelio de *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Verticillium spp.*, *Fusarium solani* y *Stachybotrys chartarum* se analizaron mediante qPCR con los cebadores seleccionados (Conjunto-II). Todos los hongos analizados no se detectaron o se detectaron con valores de Ct más altos y fuera del intervalo de la plantilla de ADN más diluida (120 copias del gen) de la curva patrón. Como en la práctica, el análisis de qPCR debe realizarse en el ADN total extraído de las hojas, estos resultados muestran que el procedimiento qPCR es específico para hongos *E. necator* y la presencia de otros hongos contaminantes no interfiere en la cuantificación del mildiú pulverulento en las hojas.

Ejemplo 2: Cuantificación *in vivo* de ADN de *Erysiphe necator* en hojas de vid

Para validar la sensibilidad y precisión del procedimiento en muestras biológicas, El análisis de qPCR se aplicó al ADN extraído total de discos foliares contaminados con diluciones seriadas de esporas de *E. necator* en bioensayos de laboratorio. El ADN total se extrajo en 4 discos foliares y se analizaron 100 ng de ADN con el procedimiento de análisis qPCR para cada concentración de esporas probada en diferentes períodos de incubación.

El número de genes diana de *E. necator* se determinó a partir de la curva patrón de plásmido de ADN. La concentración más baja de 2 esporas/cm², probada inmediatamente después de la pulverización (d+0) se detectó a Ct = 27,13 ciclos equivalentes a $9,4 \times 10^2$ copias del gen. De forma interesante, la cuantificación de qPCR de otras concentraciones de esporas probadas muestra que el número de copias de genes aumenta proporcionalmente con el número de esporas de *E. necator* en la superficie de la hoja. La concentración de esporas más alta probada (C4 = 175 esporas/cm²) se detectó en Ct = 21,98 ciclos correspondientes a $3,5 \times 10^4$ copias del gen. Casi todos los discos foliares incubados en condiciones adecuadas de crecimiento de mildiú pulverulento muestran aumento del gen diana de *E. necator* cuantificado en muestras. Estos resultados confirman la correlación entre la cantidad de ADN analizada por el procedimiento qPCR y la evolución de la biomasa de hongos en las hojas estimada por anotaciones visuales. La cantidad de ADN de *E. necator* medido por análisis de qPCR alcanza $1,3 \times 10^6$ copias del gen después de 12 días de incubación de discos foliares infectados con esporas concentradas a 175 esporas/cm².

Por lo tanto, el uso del procedimiento de análisis qPCR permite detectar y cuantificar específicamente el ADN de esporas de *E. necator* en una fase más temprana en las hojas de la vid incluso antes de la germinación y la aparición de síntomas visuales. La sensibilidad del procedimiento en ensayos biológicos permite detectar la presencia de esporas en hojas tan baja como 2 esporas/cm².

Ejemplo 3: Evaluación de ADN de *E. necator* mediante análisis de qPCR en contaminación de campo

Para validar el procedimiento qPCR en condiciones de campo, la contaminación artificial se llevó a cabo en parcelas de vid en diferentes fechas con diferentes densidades de inóculos preparados en laboratorio.

Los ensayos se realizaron en el viñedo francés St Martin d'Armagnac (Gros Manseng) de abril a agosto de 2013. Se probaron parcelas de viñedos plantadas con 10 plantas con una parcela adyacente de 5 plantas no inoculadas. Las hojas se contaminaron con pulverización de soluciones de esporas de *E. necator* a diferentes concentraciones: C1 (0,1 esporas/cm²), C2 (1 esporas/cm²) y C3 (10 esporas/cm²). La inoculación artificial de esporas de mildiú pulverulento se realizó en tres fechas diferentes: 18 de abril, 07 de mayo y 23 de mayo. Para cada condición, se recolectaron 5 hojas en d+0, d+7, d+14 y d+30 días después de la contaminación para el análisis de qPCR.

Las cinco hojas se muestrearon para cada condición probada y se prepararon discos foliares agrupados a partir de estas hojas. Se extrajo el ADN total y se analizaron 100 ng mediante qPCR. Por lo tanto, Los datos de qPCR expresan la cantidad de ADN de *E. necator* en cinco hojas por muestra.

El análisis de hojas recolectadas de parcelas de vid Gros Manseng para la primera fecha de inoculación (23 de abril de 2013) muestra la presencia de ADN de *E. necator* ($1,1 \times 10^3$ copias del gen) solo en muestras correspondientes a hojas infectadas con concentraciones de esporas C2 (1 espóra/cm²) y C3 (10 esporas/cm²) cuando se recolectan inmediatamente después de la contaminación (d+0). El ADN diana también se amplificó ($4,2 \times 10^3$ copias del gen) en el ADN total extraído de hojas contaminadas con C3 (10 esporas/cm²) y recogido en d+14. No se detectó ADN de *E. necator* en las otras muestras probadas.

Para la segunda fecha de inoculación (07 de mayo de 2013), se observó una amplificación significativa en hojas infectadas con las tres concentraciones probadas de esporas de *E. necator* y recolectadas en d+0 ($1,03 \times 10^3$ copias

del gen para C1, $1,1 \times 10^3$ copias del gen para C2 y $1,03 \times 10^3$ copias del gen para C3). Las hojas recolectadas después de 30 días de contaminación de prueba artificial mostraron presencia de ADN de *E. necator* a $9,93 \times 10^3$ y $2,38 \times 10^3$ copias del gen para C2 (1 espora/cm²) y C3 (10 esporas/cm²) respectivamente. En todas las muestras recogidas con fecha de contaminación 23 de mayo de 2013, solo las hojas probadas con C2 (1 espora/cm²) y recolectadas inmediatamente (d+0) detectaron ADN de *E. necator*.

Estos resultados muestran que el ADN de *E. necator* es detectable cuando el hongo se desarrolla en las plantas.

Ejemplo 4: Contaminación del campo artificial y natural 2014: Análisis de qPCR y progreso del mildiú pulverulento

Para evaluar adicionalmente el procedimiento qPCR, en 2014 se realizaron otras pruebas en dos ensayos contaminados artificialmente y cuatro ensayos naturales en diferentes regiones. Para cada muestra en ensayo natural, se recolectaron 10 hojas. Por el contrario, se recolectaron 5 hojas en una prueba de contaminación artificial por cada concentración de esporas pulverizadas (C1 = 0,1 esporas/cm², C2 = 1 esporas/cm² y C3 = 10 esporas/cm²). Se analizaron 4 discos foliares por hoja para ambos ensayos. En un ensayo contaminado artificialmente denominado "14 00 06-EN" realizado el 9 de abril de 2014, *E. necator* se detectó en d+0 (correspondiente a hojas frescas recolectadas) en 5 hojas de las 15 recolectadas, 4 de estas hojas habiendo sido contaminadas con la concentración C3 más alta probada y 1 hoja con la concentración C1. La mitad de las hojas recolectadas después de 7 días (d+7) y 14 días (d+14) contienen *E. necator*. De la muestra de hojas analizada después de 30 días (d+30), 6 hojas se probaron positivamente para *E. necator*. En otras fechas probadas, se detectó mildiú pulverulento en hojas en diferente proporción. La proporción de hojas que contienen *E. necator* en d+0 varían entre 2 (prueba realizada el 23 de abril de 2014) y 6 hojas (prueba realizada el 7 de mayo de 2014) de 15 hojas recolectadas para las tres concentraciones probadas.

Al mismo tiempo, también se realizó un seguimiento en 4 vides sin ninguna introducción de esporas de *E. necator*. En este caso, se recolectaron 10 hojas en diferentes etapas y se enviaron al laboratorio para análisis de qPCR. Para la prueba "14 00 08 EN-B", el análisis de qPCR detectó ADN de *E. necator* en hojas recolectadas en la Fecha 2 (30 de abril de 2014) y la Fecha 3 (13 de mayo de 2015), pero no en la Fecha 1 (17 de abril de 2014). La frecuencia de hojas naturalmente contaminadas por mildiú pulverulento difirió entre las áreas probadas (Zona 1, Zona 2 y Zona 3). En hojas recolectadas de la Zona 1, el ADN *E. necator* estaba altamente presente en 9 de cada 10 hojas recolectadas. Al mismo tiempo, se realizó la anotación visual en vid y no se observaron visualmente síntomas de mildiú pulverulento en esta etapa. La necrosis por *E. necator* comenzó a aparecer solo 15 días después (primera anotación visual el 22 de mayo de 2014).

El análisis de qPCR de las hojas recolectadas en las otras pruebas de monitorización mostró presencia de ADN de *E. necator* en pocas hojas solo en D1 (23 de abril de 2014), pero no se detectó mildiú pulverulento en las hojas en las otras dos fechas analizadas (05 y 19 de mayo de 2014). Se obtuvieron los mismos datos con otra prueba, en la que solo se identificaron 2 hojas que contenían ADN *E. necator* para D1 (22 de abril de 2014) y no se detectó infección por qPCR en hojas recolectadas en D2 (05 de mayo de 2014) y D3 (02 de junio de 2014).

De acuerdo con los resultados de qPCR, las esporas de *E. necator* estaban presentes al comienzo de la prueba en baja frecuencia y no se ha producido ningún desarrollo en fechas posteriores. Las anotaciones visuales en el campo confirmaron esta hipótesis porque los síntomas del mildiú pulverulento solo se observaron al final de la temporada. La detección con el procedimiento de acuerdo con la invención se correlaciona bien con la presencia del hongo y su desarrollo en las plantas.

Ejemplo 5: Análisis de qPCR y monitorización de síntomas de mildiú pulverulento en situaciones de infestación natural

En 2015 se han realizado más pruebas en condiciones de infestación natural en dos regiones diferentes de Francia (región de Champagne y región de Armagnac). En cada región, los ensayos se llevaron a cabo en varias parcelas (10 parcelas en la región de Champagne y 9 parcelas en la región de Armagnac). Para cada prueba, Se recolectaron muestras de 10 hojas por parcela. Por otra parte, esta cantidad de muestras se recogió en tres etapas diferentes de desarrollo de las plantas de vid: se realizó una primera recolección de muestra en la etapa de desarrollo BBCH 14/15 (4 a 5 hojas desarrolladas), una segunda recolección de muestra en la etapa BBCH 53 (6 a 7 hojas desarrolladas) y una tercera recolección de muestra en la etapa BBCH 57 (8 a 10 hojas desarrolladas).

En paralelo, la aparición y el desarrollo de los síntomas foliares también se han monitorizado cuidadosamente. Este seguimiento se realizó a partir de los 15 días después del estadio BBCH 14/15, después cada 15 días hasta los estadios tardíos del desarrollo, incluyendo el estadio BBCH 61 (floración) y el estadio BBCH 71 (formación de frutos).

Una observación importante fue que, en las parcelas de ambas regiones, el procedimiento qPCR de acuerdo con la invención fue capaz de detectar *E. necator* muy temprano en el desarrollo de la vid. En las dos regiones, se ha podido detectar la presencia de *E. necator* desde el primer estadio de desarrollo evaluado, BBCH 14/15, mucho antes de que pudieran observarse síntomas visuales.

En la región de Champagne, el ensayo también reveló que el desarrollo de la enfermedad estaba progresando en las diferentes parcelas (solo 3 parcelas de 10 mostraron la presencia de *E. necator* en el estadio BBCH 14/15, mientras

5 que 8 parcelas de 10 lo mostraron en el estadio BBCH 57). Por otra parte, los síntomas foliares solo comenzaron a ser observables en el estadio BBCH 57 y después progresaron en las diferentes parcelas hasta el estadio BBCH 71. El ensayo en la región de Champagne experimentó sin embargo una infestación moderada, debido a la aplicación preventiva de fungicidas durante la prueba. Esta última observación al menos muestra que los tratamientos preventivos pueden mantener el desarrollo de síntomas de *E. necator* bajo control, aunque la presencia del hongo se observó por qPCR muy temprano en el desarrollo de la vid.

10 En la región de Armagnac, *E. necator* también se ha detectado temprano en algunas parcelas (en BBCH 14/15), pero no mostró una progresión significativa en más parcelas a medida que se desarrollaban las vides (solo 3 parcelas mostraron cantidades detectables de *E. necator* usando el procedimiento qPCR en el estadio BBCH 57). Esto puede explicarse por el hecho de que la enfermedad ha progresado lentamente, debido posiblemente a las condiciones climáticas durante la prueba, ya que no pudieron observarse síntomas foliares visuales antes del estadio BBCH 61. Sin embargo, no se produjeron tratamientos con fungicidas en estas parcelas y el ensayo reveló que la enfermedad se ha desarrollado en gran medida durante los últimos estadios de desarrollo (BBCH 61 y BBCH 71). Y curiosamente, las parcelas que parecían estar más infestadas en estos últimos estadios de desarrollo eran las mismas en las que se había detectado *E. necator* en estadios tempranos (BBCH 14/15 y BBCH57) por el procedimiento qPCR. Estos resultados demuestran además que el procedimiento qPCR de acuerdo con la invención es un procedimiento preciso para detectar *E. necator* en viñedos en fases muy tempranas del desarrollo de las plantas, permitiendo de esta manera que se apliquen tratamientos preventivos, pero precisos, antes de que la enfermedad pueda extenderse y realmente afectar al cultivo.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bayer SAS
- <120> Procedimientos y kits para la detección del mildiú pulverulento
- <130> BCS154006
- <160> 7
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Uncinula necator
- 30 <400> 1
- gacagagtga cgctcgtgat 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> ADN
- 35 <213> Uncinula necator
- <400> 2
- ttcagcgggt attcctacct 20
- <210> 3
- <211> 20
- <212> ADN
- 40 <213> Uncinula necator
- <400> 3
- gtggccctta aagacagtgg 20
- <210> 4
- <211> 20
- <212> ADN
- 45 <213> Uncinula necator
- <400> 4
- ctgtcgcgag gaacaagtta 20
- 50 <210> 5
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Uncinula necator

ES 2 821 751 T3

	<400> 5	
	tcactctgtc gcgaggaac	19
5	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Uncinula necator	
	<400> 6	
	cacctttgtc cggatcatccg g	21
10	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Uncinula necator	
	<400> 7	
	ctacgcgtag agcccacgcg	20

REIVINDICACIONES

1. Un cebador oligonucleotídico seleccionado del grupo que consiste en:
 - (i) oligonucleótidos que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;
 - (ii) oligonucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;
 - (iii) oligonucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de los oligonucleótidos SEQ ID NO: 1,2 o sus secuencias de nucleótidos complementarias, con la excepción del oligonucleótido específico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2.
2. Un par de cebadores oligonucleotídicos, en el que el par consiste en:
 - (i) el par de oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 para el cebador directo y SEQ ID NO: 2 para el cebador inverso;
 - (ii) el par de oligonucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos complementarias a las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 para el cebador inverso y SEQ ID NO: 2 para el cebador directo;
 - (iii) cualquier par de oligonucleótidos que tenga las secuencias de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de los pares de oligonucleótidos en (i) y (ii).
3. Una sonda oligonucleotídica seleccionada del grupo que consiste en:
 - (i) el oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6;
 - (ii) el oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6;
 - (iii) cualquier oligonucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de los oligonucleótidos en (i) y (ii);

en la que la sonda oligonucleotídica tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos y hasta 30 nucleótidos.
4. Una sonda de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 3, seleccionada del grupo que consiste en:
 - (i) el oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6;
 - (ii) el oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6.
5. Un procedimiento para la detección específica del hongo *Erysiphe necator*, que comprende:
 - (a) someter una muestra a amplificación por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) usando un par de cebadores oligonucleotídicos (i) que comprende al menos un cebador oligonucleotídico de la reivindicación 1 o (ii) que consiste en un par de cebadores oligonucleotídicos de la reivindicación 2; y
 - (b) determinar la presencia o ausencia, de *Erysiphe necator* en la muestra visualizando, o no, el ADN diana amplificado por la qPCR.
6. Un procedimiento para la cuantificación específica del hongo *Erysiphe necator*, que comprende:
 - (a) someter una muestra a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) usando un par de cebadores oligonucleotídicos (i) que comprende al menos un cebador oligonucleotídico de la reivindicación 1 o (ii) que consiste en un par de cebadores oligonucleotídicos de la reivindicación 2; y
 - (b) si está presente, determinar la cantidad de *Erysiphe necator* en la muestra comparando la cantidad medida de ADN diana amplificado por qPCR con los datos de amplificación del ADN de referencia.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que el par de cebadores oligonucleotídicos es cualquier par de la reivindicación 2.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la determinación de la presencia o cantidad de *Erysiphe necator* en la muestra se realiza con un colorante intercalante de ADN no específico.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el colorante intercalante de ADN no específico es el compuesto SYBR Green.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la determinación de la presencia o cantidad de *Erysiphe necator* en la muestra se realiza con una sonda oligonucleotídica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que la amplificación comprende amplificar al menos una parte de la secuencia del espaciador transcrito intergénico (ITS) de *Erysiphe necator*.
12. Un kit de diagnóstico usado para la detección y/o la cuantificación del hongo *Erysiphe necator*, que comprende al

menos un cebador oligonucleotídico de la reivindicación 1 o un par de cebadores oligonucleotídicos de la reivindicación 2.

13. El kit de diagnóstico de la reivindicación 12, que comprende un par de cebadores oligonucleotídicos de acuerdo con la reivindicación 2.

5 14. El kit de diagnóstico de la reivindicación 13, que comprende una sonda oligonucleotídica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4.

15. El kit de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, que comprende el par de cebadores oligonucleotídicos de la reivindicación 2 y la sonda oligonucleotídica de la reivindicación 4.

10 16. El kit de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, que comprende además un colorante intercalante de ADN no específico.

17. El kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el colorante intercalante de ADN no específico es el compuesto SYBR Green.