

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
27 de enero de 2011 (27.01.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/009992 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2010/070506

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de julio de 2010 (22.07.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200901627 22 de julio de 2009 (22.07.2009) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA** [ES/ES]; Avda. Medina Azahara, 5, E-14071 Córdoba (ES). **ALCALIBER S.A.** [ES/ES]; Fernando El Santo nº 23, E-28010 Madrid (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **LANDA DEL CASTILLO, Blanca** [ES/ES]; Instituto de Agricultura Sostenible, Alameda del Obispo, Apdo. 4084, E-14080 Córdoba (ES). **JIMÉNEZ DÍAZ, Rafael Manuel** [ES/ES]; Dpto. Agronomía, Campus de Rabanales, Ctra. de Madrid, E-14071 Córdoba (ES). **MONTES BORREGO, Miguel** [ES/ES]; Instituto de Agricultura Sostenible, Alameda del Obispo, Apdo. 4084, E-14080 Córdoba (ES).

(74) Representante común: **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**; Avda. Medina Azahara, 5, E-14071 Córdoba (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING, IDENTIFYING AND QUANTIFYING *PERONOSPORA ARBORESCENS* BY REAL-TIME QUANTITATIVE PCR

(54) Título : MÉTODO PARA LA DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *PERONOSPORA ARBORESCENS* POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

(57) Abstract: The method for quantifying *Peronospora arborescens* by quantitative PCR (qPCR) in a biological sample comprises extracting the DNA contained in said biological sample and amplifying that DNA by means of qPCR. The invention is of use in the quantification of *P. arborescens*.

(57) Resumen: El método para la cuantificación de *peronospora arborescens* por PCR cuantitativa (qPCR) en una muestra biológica comprende extraer el ADN contenido en dicha muestra biológica y amplificarlo mediante qPCR. De aplicación en la cuantificación de *P. arborescens*



WO 2011/009992 A2

MÉTODO PARA LA DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *PERONOSPORA ARBORESCENS* POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención concierne, en general, a la detección y cuantificación de patógenos de plantas y, en particular, con un método para la cuantificación de *Peronospora arborescens* basado en la amplificación por PCR cuantitativa de regiones específicas en el ADN de dicho patógeno.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La adormidera (*Papaver somniferum*) es la única fuente de morfina, codeína y tebaína farmacéuticas, que son fármacos clave para aliviar el dolor crónico asociado con enfermedades de cáncer. En España se cultivan anualmente alrededor de 9.500 ha de adormidera, principalmente en las regiones meridional (Andalucía) y central (Castilla-La Mancha y Castilla-León) del país (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390, Montes-Borrego, M. et al. 2009; *Phytopathology* 99:73-81). Esta superficie de cultivo representa cerca del 5% de la adormidera cultivada de manera legal en todo el mundo, lo que hace que España sea, respectivamente, el tercer y cuarto productor más grande de Europa y mundial de paja de adormidera rica en morfina (INCB, 2006).

Los cultivos comerciales de adormidera en España pueden verse afectados por varias enfermedades de etiología diversa (Aranda, S. et al. 2008. *Plant Dis.* 2:317, Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390). Sin embargo, durante los últimos 5 años el Mildiu se ha convertido en el principal factor que limita el rendimiento de este cultivo en el país (Montes-Borrego, M. et al. 2009; *Phytopathology* 99:73-81). En la actualidad, los ataques del Mildiu se producen en todas las áreas que cultivan adormidera en España y su incidencia y gravedad han aumentado continuamente desde que se registraron los primeros ataques de la enfermedad (Landa, B. B. et al. 2005. *Plant Dis.* 89:338). En España y Francia, los ataques de Mildiu en los campos comerciales de adormidera son causados por el oomiceto biotrofo obligado *Peronospora arborescens* (Landa, B. B. et al. 2005. *Plant Dis.* 89:338, Montes-Borrego, M. et al. 2008. *Plant Dis.* 92:834), en comparación con Australia donde se ha identificado a *P. cristata* como el agente causal de la enfermedad (Scott, J. B. et al. 2004. *Mycol. Res.* 108:198-295).

La detección exacta y la identificación apropiada del agente causal son esenciales para el control eficaz de una enfermedad de plantas. Durante los últimos 15 años han surgido técnicas moleculares basadas principalmente en ensayos convencionales de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como principal herramienta para diagnosticar e identificar hongos fitopatógenos, que han contribuido a mitigar algunos de los problemas asociados con la detección, el control y la contención de patógenos de plantas (Henson, J.M. et al. 1993. Annu. Rev. Phytopathol. 31:81-109). Gracias a esta tecnología, recientemente se han realizado progresos considerables en el desarrollo de protocolos moleculares para la detección de *P. arborescens* en diferentes tejidos vegetales (Landa, B. B. et al.; 2007. Phytopathology 97:1380-1390, Montes-Borrego, M. et al. 2009; Phytopathology 99:73-81). En un trabajo reciente (Landa, B. B. et al.; 2007. Phytopathology 97:1380-1390) se ha desarrollado un protocolo de PCR simple específico de *P. arborescens* usando cualesquiera de dos conjuntos de pares de cebadores (OMPac1fw/OMPac1rv y OMPac7fw/OMPac7rv) que: (i) puede usarse para la detección de patógenos en cápsulas, hojas, raíces, semillas y tallos de plantas de adormidera; (ii) es lo bastante sensible para detectar de 0,1 a 10 pg de ADN de *P. arborescens*; y (iii) es altamente específico ya que no se produce la amplificación cruzada con otros patógenos estrechamente relacionados en tejidos infectados de adormidera, especialmente de *P. cristata*. Posteriormente se ha logrado una mejora significativa para la detección *in planta* de ADN de *P. arborescens* mediante un protocolo de PCR anidada desarrollado recientemente (Montes-Borrego, M. et al. 2009; Phytopathology 99:73-81) que tiene una sensibilidad de 2 a 3 órdenes de magnitud superior en comparación con la del ensayo de PCR simple usando los mismos cebadores, mientras que se mantienen las propiedades de este último ensayo. Ese aumento de la sensibilidad del protocolo de PCR anidada permitió la detección de tan sólo de 5 a 0,5 fg de ADN de *P. arborescens* en un fondo de 25 a 50 ng de ADN de adormidera.

Una de las limitaciones de los protocolos de PCR desarrollados es que no permiten cuantificar el nivel de infección en la planta por el patógeno. Un método de PCR cuantitativo y sensible sería particularmente útil para estudios epidemiológicos, el diseño de estrategias de control de enfermedades y cuarentena, particularmente para: (i) identificar la existencia de germoplasma de adormidera resistente o tolerante mediante la cuantificación del patógeno en infecciones sintomáticas y asintomáticas; (ii) establecer una correlación entre la cantidad de enfermedad que puede desarrollarse a partir del uso

de lotes de semillas comerciales con la cantidad de patógeno cuantificada en las mismas, que ayudaría a evitar el uso de lotes de semillas que representan un riesgo potencial para el desarrollo de epidemias; y (iii) correlacionar la cantidad de patógeno en tejidos vegetales infectados con el nivel de desarrollo de la enfermedad y/o expresión de
5 síntomas posterior tras el uso de medidas de control de enfermedades (biológicas, químicas o físicas).

La PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real se introdujo en la monitorización de patógenos de plantas directamente a partir de tejidos vegetales a finales de los años 90, y desde entonces se ha adaptado para su uso en muchos sistemas de plantas-patógenos,
10 incluyendo varios oomicetos, hongos, bacterias, nemátodos y virus patógenos de plantas (véase, por ejemplo, Schena, L., et al. 2004. Eur. J. Plant Pathol. 110: 893-908). En el caso de los oomicetos, la mayoría de los ensayos de qPCR se han desarrollado para diferentes especies de *Pythium* (Atallah, Z. K., y W. R. Stevenson. 2006. Phytopathology 96:1037-1045) y *Phytophthora* (Atallah, Z. K., y W. R. Stevenson.
15 2006. Phytopathology 96:1037-1045, Avrova, A. et al. 2003. Fung. Genet. Biol. 40:4-14). Además, se han desarrollado algunos ensayos de qPCR para los oomicetos biotrofos obligados como *Plasmopara viticola* (Valsesia, G et al. 2005. Phytopathology 95:672-678) y para algunas especies de *Peronospora*, incluyendo *P. sparsa* (Hukkanen, A et al. 2006. Eur. J. Plant Pathol. 116:225-235) y *P. parasitica* (Brouwer, M. et al. 2003. FEMS
20 Microbiol. Lett. 228:241-248). La identificación y la detección a través de qPCR en tiempo real puede ser útil para resolver problemas derivados de la naturaleza de la biotrofia estricta de *Peronospora* spp., relacionados principalmente con la imposibilidad de aislar el patógeno a partir de tejidos infectados y del cultivo convencional *in vitro*.

La química de los ensayos qPCR en tiempo real utilizados para la detección y el
25 estudio de microorganismos fitopatógenos pueden agruparse en métodos no específicos de secuencia (Schroeder, K. L. et al. 2006. Phytopathology 96:637-647) y métodos específicos de secuencia (TaqMan, Molecular Beacons, Scorpion-PCR, etc.) (Valsesia, G et al. 2005. Phytopathology 95:672-678) de amplicones. La química específica de secuencia es más específica pero aumenta el coste del análisis cuando se usan esos
30 métodos de un modo generalizado y práctico. El uso del colorante fluorescente SYBR Green I para la detección de amplicones es un método bueno y fiable si los cebadores específicos están bien diseñados; pero de manera más importante, es probablemente la opción más económica en comparación con otras químicas, permitiendo de ese modo

realizar un número superior de ensayos de qPCR para aplicaciones prácticas en estudios de campo.

En la qPCR en tiempo real, cada reacción está caracterizada por un número de ciclos específico, el ciclo umbral (C_T), en el que puede detectarse un aumento estadísticamente significativo de la fluorescencia por encima del nivel inicial. El C_T es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración de la secuencia diana. Esto significa que cuanto más molde esté presente en una muestra de PCR menor es el número de ciclos de amplificación necesarios para alcanzar el punto en el que puede detectarse la fluorescencia por encima del nivel inicial (Lie, Y. S. et al. 1998. Curr. Opin. Biotechnol. 9:43-48). Los métodos de análisis de qPCR en tiempo real obtenidos comparando los valores de C_T de las muestras de prueba con respecto a una curva patrón que se origina a partir de muestras de concentración conocida, se conocen comúnmente como cuantificación absoluta. Para la cuantificación absoluta, la exactitud de la cuantificación de muestras desconocidas depende por completo de la exactitud de los patrones. Por tanto, se requiere mucho cuidado para el diseño, la síntesis, la purificación y la calibración de patrones de ADN (Vaerman, J. L. et al. 2004. J. Biol. Regul. Homeost. Agents 18: 212-214). En el caso de microorganismos biotrofos obligados, tales como *P. arborescens*, pueden obtenerse muestras de ADN para obtener curvas patrón a partir de micelios y esporangios fragmentados a partir de hojas en esporulación (Hukkanen, A et al. 2006. Eur. J. Plant Pathol. 116:225-235; Landa, B. B. et al.; 2007. Phytopathology 97:1380-1390). Además, más recientemente, se han construido curvas patrón absolutas a partir de plásmidos que contienen el ADN diana como un inserto clonado (Hukkanen, A et al. 2006. Eur. J. Plant Pathol. 116:225-235).

En la presente invención, se ha desarrollado un ensayo de qPCR en tiempo real económico, rápido, innovador y fiable para identificar y cuantificar ADN de *P. arborescens* en diferentes tejidos de adormidera. Asimismo, se han evaluado los efectos de diferentes tejidos vegetales huéspedes en la amplificación, reproducibilidad y sensibilidad de los ensayos, y en los límites de detección comparando la sensibilidad del protocolo de qPCR en tiempo real con los protocolos de PCR simple y anidada específicos para *P. arborescens* previamente desarrollados (Landa, B. B. et al.; 2007. Phytopathology 97:1380-1390, Montes-Borrego, M. et al. 2009; Phytopathology 99:73-81). Además se ha desarrollado una curva patrón basada en ADN extraído de un plásmido con el ADN diana como inserto clonado, y se ha establecido una relación

numérica robusta con una curva patrón basada en ADN genómico de *P. arborescens* para facilitar su uso a una escala mayor y por laboratorios diferentes. De esta manera, se ha llegado a establecer un protocolo universal para cuantificar *P. arborescens* en tejidos de adormidera que: (i) no depende de la obtención de micelio de este biotrofo estrictamente obligado que va a aplicarse; (ii) es altamente reproducible y fácil de usar por técnicos diferentes en laboratorios diferentes; y (iii) la muestra de ADN inicial para obtener la curva patrón y la propia curva patrón pueden almacenarse y conservarse durante un periodo de tiempo prolongado sin perder la exactitud en la cuantificación. Finalmente, la robustez y eficiencia del ensayo recientemente desarrollado se han constatado cuantificando la cantidad de *P. arborescens* en muestras infectadas de manera natural de múltiples orígenes, incluyendo semillas de cápsulas asintomáticas y lotes de semillas comerciales, así como de plantas de adormidera asintomáticas infectadas sistémicamente por *P. arborescens*.

15 COMPENDIO DE LA INVENCION

Peronospora arborescens es un hongo patógeno responsable, entre otras, de la enfermedad de Mildiu de la adormidera (*Papaver somniferum*). El desarrollo de un método de identificación y detección específico de dicho patógeno y además altamente reproducible, permite un diagnóstico temprano de la enfermedad útil en el control de la misma, evitando de este modo la distribución del patógeno a otras áreas de cultivo.

El protocolo de PCR específico de *P. arborescens* desarrollado en esta invención solventa los inconvenientes que presentan las técnicas actuales porque permite cuantificar la cantidad de patógeno en la muestra y además es altamente reproducible.

La invención se relaciona, por tanto, con un método para la cuantificación de *Peronospora arborescens* por PCR cuantitativa en una muestra biológica, que comprende:

- (i) extracción del ADN contenido en dicha muestra biológica; y
- (ii) amplificación del ADN extraído en la etapa (i) mediante PCR cuantitativa con los oligonucleótidos identificados por las secuencias SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de la pareja de oligonucleótidos SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, en una reacción de amplificación por PCR cuantitativa para cuantificar la presencia de *P. arborescens* en una muestra biológica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** describe los perfiles de amplificación por PCR en tiempo real generados a partir de la recogida ciclo por ciclo de ADN genómico de *P. arborescens* (10 ng/μl) diluido en serie [1:1 (●), 1:10 (○), 1:10² (□), 1:10³(△), 1:10⁴(◇) y 1:10⁵(▽)] en agua estéril ultrapura (AEU) (G_W) (**A**) así como en un fondo fijo de ADN de *Papaver somniferum* (40 ng/μl) extraído de semillas sanas de adormidera (G_S) (**C**), y análisis de las curvas de fusión respectivas para G_W (**B**) y G_S (**D**), mostrados como la primera derivada negativa de las unidades de fluorescencia relativas -d(RFU)/dt representada frente a la temperatura. (*) ADN desinfectado libre de patógeno o agua (G_W) de *P. somniferum* (G_S); (×) sin molde de ADN. La posición umbral para determinar el número de ciclos de PCR se fijó manualmente a 400. Cada serie de dilución se repitió dos veces (líneas continuas y discontinuas).

La **Figura 2** describe diagramas de cajas que muestran la reproducibilidad de los ensayos de qPCR usando los pares de cebadores P3Pa2fw/P3Pa2rv (conjunto P2), OMPac1fw/OMPac1rv (conjunto P3) y OMPac7fw/OMPac7rv (conjunto P6). Se representaron los ciclos umbral (C_T) frente al logaritmo de las curvas patrón de ADN genómico de *Peronospora arborescens* (desde 10 ng hasta 100 fg) diluido en agua (gráficos G1_W) o en ADN de *Papaver somniferum* (40 ng) extraído de semillas (gráficos G1_S). Cada concentración de ADN en cada ADN de fondo se sometió a prueba para los tres conjuntos de cebadores en la misma placa por duplicado y el experimento se repitió dos veces.

La **Figura 3** muestra rectas de regresión patrón de (**A**) una dilución en serie de 10 veces de cinco puntos de ADN de *Peronospora arborescens* (1 ng/μl; serie G) o (**B**) una dilución en serie de 10 veces de seis puntos de ADN del plásmido EC3_P38ESJ (1 ng/μl; serie P) que contienen la región ITS del patógeno, diluido en agua estéril ultrapura (G_W y P_W), o en ADN de *Papaver somniferum* (40 ng) extraído de las hojas (G_L y P_L) o de las semillas (G_S y P_S). Se representaron los ciclos umbral (C_T) frente al logaritmo de las curvas patrón de ADN genómico de concentraciones conocidas. Los datos mostrados son de dos curvas patrón de ADN independientes y de dos técnicos independientes, y cada punto de datos representa la media de dos repeticiones de qPCR.

La **Figura 4** muestra la sensibilidad del método en electroforesis en gel de agarosa de cebadores OMPac7fw/OMPac7rv (conjunto P6) específicos de *Peronospora arborescens* en ensayos de PCR simple, cuantitativa y anidada usando ADN de *P. arborescens* (1 ng/μl; serie G) o ADN del plásmido EC3_P38ESJ (1 ng/μl; serie P) diluido en agua estéril ultrapura (G_W y P_W), o en ADN de *Papaver somniferum* (40 ng) extraído de las hojas (G_L y P_L) o de las semillas (G_S y P_S). M, mezcla de marcadores de tamaño molecular de ADN Gene-ruler™ (Fermentas, St Leon-Rot, Alemania); serie de dilución de ADN 1:1 (carril 1); 1:10¹ (carril 2); 1:10² (carril 3); 1:10³ (carril 4); 1:10⁴ (carril 5); 1:10⁵ (carril 6); agua (G_W), ADN libre de patógenos de *P. somniferum* ($G_{L,S}$) o serie de dilución de ADN 1:10⁶ ($P_{W,L,S}$) (carril 7); sin molde de ADN (carril 8).

La **Figura 5** muestra **(A)** las desviaciones estándar y **(B)** las rectas de regresión patrón de una dilución en serie de 10 veces de cinco puntos de ADN de *Peronospora arborescens* (1 ng/μl; serie G) o una dilución en serie de 10 veces de seis puntos de ADN del plásmido EC3_P38ESJ (1 ng/μl; serie P) que contienen la región ITS del patógeno, ambos diluidos en ADN de *Papaver somniferum* (40 ng) extraído de las hojas (G_L y P_L) o de las semillas (G_S y P_S). Se representaron los ciclos umbral (C_T) frente al logaritmo de las curvas patrón de ADN genómico de concentraciones conocidas. Los datos mostrados son a partir de cinco curvas patrón de ADN independientes y dos técnicos independientes, y cada punto de datos representa la media de dos repeticiones de qPCR.

La **Figura 6** muestra la cuantificación de ADN de *Peronospora arborescens* en el tallo de plantas de *Papaver somniferum* infectadas asintomáticamente. **(A)** Rectas de regresión patrón de una dilución en serie de 10 veces de seis puntos de ADN de *P. arborescens* (1 ng/μl; serie G_L) o una dilución en serie de 10 veces de siete puntos de ADN del plásmido EC3_P38ESJ (1 ng/μl; serie P_L) que contienen la región ITS del patógeno, ambos diluidos en ADN de *P. somniferum* (40 ng) extraído de las hojas y usado en los ensayos de qPCR. Los datos mostrados son la media de tres placas para PCR independientes y de dos repeticiones de qPCR ± desviación estándar. **(B)** Cantidades relativas de ADN de *P. arborescens* en ADN de *P. somniferum* (ppm) cuantificadas en cada planta individual. Los datos mostrados son la media de dos

repeticiones de qPCR $\pm$ desviación estándar. (*) La escala para estas dos muestras de tallo está en el eje Y a la derecha.

La **Figura 7** muestra la cuantificación de ADN de *Peronospora arborescens* en muestras de lotes de semillas comerciales de *Papaver somniferum*. **A:** Rectas de regresión patrón de una dilución en serie de 10 veces de seis puntos de ADN de *P. arborescens* (1 ng/ μ l; serie G_L) o una dilución en serie de 10 veces de siete puntos de ADN del plásmido EC3_P38ESJ (1 ng/ μ l; serie P_L) que contienen la región ITS del patógeno, ambos diluidos en ADN de *P. somniferum* extraído de las semillas y usado en los ensayos de qPCR. Los datos mostrados son la media de dos placas para PCR independientes y de dos repeticiones de qPCR $\pm$ desviación estándar. **B, C, D:** Cantidades relativas de ADN de *P. arborescens* en ADN de *P. somniferum* (‰) cuantificadas en cada muestra de semillas (300 mg). Los datos mostrados son la media de dos repeticiones de qPCR $\pm$ desviación estándar. (+), ($\pm$) y (-) indican amplificación positiva, débil o ausencia de la misma, respectivamente, tras ensayos de PCR simple o anidada usando las mismas muestras de ADN que las mostradas en Montes-Borrego *et al.* (2009). (*) Esta muestra estaba por debajo del límite de detección del ensayo de qPCR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Peronospora arborescens es un oomiceto patógeno causante de la enfermedad denominada Mildiu de la adormidera (*Papaver somniferum*). El desarrollo de un método de identificación y detección específico de dicho patógeno permite un diagnóstico temprano de la enfermedad durante estados asintomáticos de la planta, con lo que se facilita el control eficiente de la misma, así como la certificación sanitaria de la semilla evitando de este modo la distribución del patógeno a zonas de cultivo donde no está presente. Además esta tecnología permite evaluar la resistencia o la tolerancia a *P. arborescens* en germoplasma de adormidera que haría posible la selección de cultivares de adormidera resistentes en programas de mejora genética vegetal

El método desarrollado en la presente invención está basado en la detección cuantitativa *P. arborescens* por PCR en tiempo real utilizando para dicha amplificación unos oligonucleótidos cebadores específicos para *P. arborescens* (SEQ ID NO: 5-6).

Por tanto, la invención se relaciona con un método, en adelante, método de la invención, para la cuantificación de *Peronospora arborescens* por PCR cuantitativa en una muestra biológica, que comprende:

- (i) extracción del ADN contenido en dicha muestra biológica; y
- 5 (ii) amplificación del ADN extraído en la etapa (i) mediante PCR cuantitativa con los oligonucleótidos identificados por las secuencias SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6.

La extracción del ADN en la etapa (i) del método de la invención puede realizarse mediante protocolos convencionales conocidos por el experto en la materia, o empleando kits comerciales, por ejemplo, el kit G-Spin IIp (Intron Biotechnology, 10 Corea) o el Fast Prep System Bio 101 (Qbiogene, Madrid, España), tal como se muestra en el Ejemplo 1 que acompaña la presente invención.

El método de la invención comprende en la etapa (ii), una reacción de amplificación del ADN extraído en la etapa (i) anteriormente citada por PCR cuantitativa, empleando unos oligonucleótidos especialmente diseñados para amplificar 15 específicamente fragmentos de las regiones espaciadores internas del ADN ribosómico de *P. arborescens*. Las condiciones particulares empleadas en la reacción de amplificación para la pareja de oligonucleótidos cebadores, denominada en la presente invención P6 (SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6), se describen en el Ejemplo 1.

Para llevar a cabo las amplificaciones por PCR en tiempo real se puede utilizar la 20 mezcla de reacción iQ SYBR Green Supermix (BioRad, Madrid, España) y el aparato iCycler IQ (BioRad), tal como se pone de manifiesto en el Ejemplo 1. Los oligonucleótidos cebadores óptimos utilizados en la amplificación son la pareja OMPac7fw/ OMPac7rv (SEQ ID NO:5 y 6, respectivamente).

P. arborescens es un oomiceto fitopatógeno que puede infectar cualquier parte y 25 órgano de sus plantas huésped. Por tanto, en una realización particular del método de la invención, la muestra biológica es una muestra de material vegetal, o una muestra de una estructura de *P. arborescens*.

A modo ilustrativo, no limitativo, dicha muestra de material vegetal incluye tejidos de semillas, cubiertas de semillas, hojas, tallos, cápsulas, raíces, etc., y mezclas 30 de las mismas.

Resulta importante destacar que el método de la invención permite detectar y cuantificar la presencia de *P. arborescens* en semillas o tejidos procedentes de semillas (como las cubiertas de éstas, pericarpio y endocarpio). Esto es de suma importancia,

pues de este modo se puede detectar y evitar la transmisión de *P. arborescens* a través de las semillas, las cuales se ha demostrado que pueden dar lugar a plantas adultas infectadas.

En una realización particular, dicha muestra biológica está infectada por *P.*
5 *arborescens*.

A modo ilustrativo, no limitativo, las estructuras del oomiceto incluyen estructuras somáticas, como el micelio, y estructuras reproductoras, tales como los esporangióforos, los esporangios, y las oosporas.

En una realización particular, la muestra biológica es una muestra de estructuras
10 de *P. arborescens*, que contiene micelio, esporangios, esporangióforos u oosporas.

El término “micelio” se refiere al conjunto de filamentos provistos de pared celular que forma el oomiceto. Cada filamento del mismo se denomina hifa.

El término “esporangióforo” se refiere a la estructura filamentosa y arborescente del oomiceto sobre cuyos extremos distales se forman los esporangios, una estructura
15 globosa con una membrana peridial simple que contiene numerosas “esporangiosporas”.

El término “esporangiosporas” se refiere a la espora producida y contenida en un esporangio.

El término “oospora” se refiere a esporas que resultan de la reproducción sexual del oomiceto mediada por heterogametangios (reproducción oógama) capaces de
20 permanecer viables en los restos de los tejidos vegetales en que se forman y en el suelo durante un largo periodo de tiempo.

En otra realización todavía más particular, la muestra biológica procede de *P. somniferum*. Dicha planta, puede encontrarse en un estado asintomático, es decir, sin síntomas ni signos distintivos que permitan saber si la planta ha sido infectada por *P.*
25 *arborescens*, o en un estado sintomático, es decir, la planta presenta los síntomas propios de la infección del patógeno como son, entre otros, enanismo, desarrollo de áreas cloróticas en el limbo foliar, deformaciones del limbo foliar y agregación de las hojas infectadas formando rosetas.

El método de la invención para cuantificar *Peronospora arborescens* presenta,
30 entre otras, las siguientes ventajas:

- (i) es posible obtener datos cuantitativos muy fiables, incluso con ADN del huésped.

- (ii) una considerable flexibilidad, puesto que puede aplicarse a diferentes muestras vegetales incluyendo cápsulas, hojas, raíces, semillas y tallos;
- (iii) alta especificidad, puesto que no se produce amplificación cruzada con otros patógenos estrechamente relacionados, especialmente con tejidos de adormidera infectados por *P. cristata*.
- (iv) alta reproducibilidad, al utilizarse los oligonucleótidos cebadores del conjunto P6 (SEQ ID NO:5 y 6), incluso en presencia de ADN de huésped.

Como se ha mencionado anteriormente, el método de la invención se basa en la cuantificación de *Peronospora arborescens* por PCR cuantitativa en una muestra biológica utilizando unos oligonucleótidos que amplifican de forma específica *P. arborescens*.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una pareja de oligonucleótidos identificados por las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 en la reacción de amplificación por PCR cuantitativa con el fin de cuantificar la presencia de *P. arborescens* en una muestra biológica. Dichos oligonucleótidos hibridan con las regiones espaciadoras transcritas internas del ADN ribosómico de *P. arborescens*.

El siguiente ejemplo sirve para ilustrar la invención y no debe ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Cuantificación de *Peronospora arborescens* en plantas de adormidera (*Papaver somniferum*)

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Se utilizaron semillas de adormidera comercial cv. Nigrum proporcionadas por Alcaliber S.A. en todo el estudio. Se sometieron a ensayo las semillas para determinar que estaban sanas mediante amplificación negativa de *P. arborescens* usando un protocolo de PCR anidada específico de esta especie (Montes-Borrego, M. et al. 2008; Plant Dis. 92:834). La superficie de las semillas se desinfestó sumergiendo éstas en NaOCl al 1% durante 5 min., y después las semillas se enjuagaron dos veces con agua

estéril ultrapura (AEU), se secaron en una campana de flujo y se almacenaron en condiciones estériles hasta su uso para los experimentos. Se cultivaron plántulas para obtener tejidos foliares maduros a partir de semillas germinadas en capas estériles de papel de filtro humedecido con 2 ml de solución de Hoagland al 50% estéril (Hoagland, D. R., and D. I. Arnon. 1950; Calif. Agric. Exp. Stn. Circ. No. 347) en placas *Petri* de 9 cm de diámetro a 20°C durante una semana. Después se trasplantaron las plántulas en una mezcla de suelos (franco arcilloso/turba, 2:1, vol/vol) pasteurizada (70°C, 60 min.) en macetas y se incubaron en una cámara de cultivo (Sanyo MLR-350 H, Sanyo Electric Co., Ltd. Japón) a 20°C y humedad relativa (HR) del 70/90% y un fotoperiodo de 12 h de luz fluorescente a $360 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

2. Material de *Peronospora arborescens*

Se obtuvieron muestras de *P. arborescens* a partir de hojas frescas con esporulación de plantas usadas para experimentos de inoculación artificial en la cámara de cultivo (M. Montes-Borrego et al., *resultados no publicados*), y a partir de hojas de plantas de adormidera infectadas de manera natural en cultivos comerciales en las granjas “Ruidero” y “Casilla San José”, Écija, provincia de Sevilla, España.

3. Construcción de plásmidos control.

Se amplificaron las regiones ITS y 5.8S de ADNr de dos muestras diferentes de *P. arborescens* (P38ESJ y M2ERUI, Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390) de nuestra colección de cultivos usando pares de cebadores DC6/ITS4 y ITS5/ITS4. Se purificaron los amplicones y se ligaron en el Sistema I de vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EE.UU.) usando la cepa JM109 de *Escherichia coli* para su transformación, tal como se describió anteriormente (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390). Se confirmó la clonación correcta secuenciando los insertos clonados (dos de cada producto de PCR) en ambas direcciones usando un kit de reacción rápida de secuenciación del ciclo de terminación (BigDye, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Madrid, España) y los cebadores DC6, ITS4 y ITS5, y cebadores universales M13-20fw M13rev. Los productos resultantes se purificaron y se hicieron pasar por un secuenciador multicapilar de ADN (ABI Prism 3100 genetic analyzer, Applied Biosystems) en las instalaciones de secuenciación de la Universidad de

Córdoba. Se almacenaron los clones transformados en glicerol (al 20%) a -80°C y se cultivaron cuando fue necesario.

4. Extracción y cuantificación de ADN

5 Se extrajo ADN genómico de *P. arborescens* y de semillas y hojas de adormidera usando el kit de extracción de ADN genómico de plantas ‘G-Spin™ IIp’ (Intron Biotechnology, Corea) y el Fast Prep System Bio 101 (Qbiogene, Madrid, España) según Landa *et al.* (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390).

10 Se extrajo ADN de plásmido de cultivos de la cepa JM109 de *E. coli* cultivada durante la noche a 37°C en caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 1 litro de H₂O [pH 7,2]) complementado con ampicilina (100 µg/ml) usando el kit de plásmidos QuickGene (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japón) y el dispositivo QuickGene-Mini80 (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japón) según las instrucciones del fabricante.

15 Se evaluó la calidad del ADN mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Se cuantificaron de manera exacta todas las muestras de ADN usando el ensayo fluorométrico de amplio espectro del kit de ensayo de ADN Quant-iT (Molecular Probes Inc., Leiden, Países Bajos) y un fluoroespectrómetro Tecan Safire (Tecan España, Barcelona, España) (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390).

20 Se tuvo especial cuidado en tomar concentraciones exactas de los ADN de plásmido, patógeno y huésped cuantificando cada muestra de ADN por triplicado, en dos microplacas independientes. Para tener un control interno de cuantificación de ADN se incluyeron muestras de ADN de adormidera y *P. arborescens* de concentración conocida en cada placa de cuantificación. Se diluyeron el ADN genómico y de plásmido con AEU

25 en caso apropiado.

5. Curvas patrón de ADN

Se obtuvieron curvas patrón de ADN a partir de diluciones de 10 veces de ADN genómico de *P. arborescens* (serie G) o de ADN de plásmido (serie P). Para este fin se

30 diluyó en serie ADN genómico de *P. arborescens* (1 ng/µl) o ADN de plásmido (1 ng/µl; equivalente a $2,33 \times 10^8$ copias/µl) [1:1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ y 1:10⁶ (sólo para la serie P)] en AEU (Curvas G_w y P_w) así como en un fondo fijado de ADN de *P. somniferum* (40 ng/µl) extraído de las hojas (Curvas G_L y P_L) y de las semillas (Curvas

G_S y P_S) de adormidera sana. Cada curva patrón siempre incluía ADN de *P. somniferum* y/o ningún ADN como controles negativos. Se obtuvieron diez curvas patrón de ADN independientes (cinco para la serie G, denominada G1-5, y cinco para la serie P, denominada P1-5) usando diferentes fuentes de ADN de planta y patógeno (**Tabla 1**), es decir: hojas de adormidera de diferente edad (hojas maduras y cotiledones), hojas y semillas de diferente origen, esporangios de *P. arborescens* de hojas con esporulación en el campo o cámara de cultivo, diferentes cultivos de plásmido, etc. Finalmente, tras construir las curvas patrón de ADN G1-5_W y P1-5_W se cuantificó por triplicado cada punto de dilución usando el kit de ensayo de ADN de alta sensibilidad Quant-iT fluorométrico (Molecular Probes Inc.), suponiendo el mismo ADN del patógeno en las curvas patrón de ADN G1-5_L G1-5_S y P1-5_L y P1-5_S.

6. Optimización, reproducibilidad y sensibilidad del protocolo de qPCR en tiempo real

Todas las amplificaciones por PCR en tiempo real se realizaron utilizando una mezcla de reacción iQ SYBR Green Supermix (BioRad, Madrid, España) y el aparato iCycler IQ (BioRad). En las fases iniciales de optimización del ensayo de PCR en tiempo real, se evaluaron las condiciones de ciclado y los pares de cebadores P3Pa2fw (SEQ ID NO: 1) /P3Pa2rv (SEQ ID NO: 2) (conjunto P2), OMPac1fw (SEQ ID NO: 3)/OMPac1rv (SEQ ID NO: 4) (conjunto P3) y OMPac7fw (SEQ ID NO: 5)/OMPac7rv (SEQ ID NO: 6) (conjunto P6) usando curvas patrón de ADN G1_W-G1_S. Estos pares de cebadores se habían diseñado para amplificar específicamente un fragmento de la región ITS de *P. arborescens* desarrollada por Landa *et al.* (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390). Para este experimento se incluyó una concentración inicial de 10 ng, pero no la concentración de patógeno más baja de 100 fg. Se ajustaron experimentalmente las condiciones de reacción, tales como el volumen de reacción, la temperatura de hibridación, la concentración del cebador y la temperatura para medir la señal de fluorescencia del amplicón, para optimizar el protocolo de qPCR en tiempo real. Tras el ciclo de amplificación final se obtuvo un perfil de temperatura de la curva de fusión calentando hasta 95°C, enfriando hasta 72°C y calentando lentamente hasta 95°C a 0,5°C cada 10 s con medición continua de la fluorescencia a 520 nm. Se analizaron todas las reacciones mediante electroforesis en gel para confirmar que sólo se

amplificó un producto de PCR en las muestras con ADN genómico de *P. arborescens* y no se obtuvo ningún producto de amplificación en los controles negativos.

Para investigar cualquier posible influencia del ADN del huésped en la exactitud de la amplificación y en la cuantificación del ADN diana (genómico o de plásmido), se usaron dos curvas patrón de ADN G1_{W,L,S}-G2_{W,L,S} y P1_{W,L,S}-P2_{W,L,S} y el par de cebadores OMPac7fw/OMPac7rv (conjunto P6). Se realizaron independientemente las reacciones en tiempo real para cada curva patrón de ADN. Todos los fondos de ADN se realizaron en la misma placa para PCR de 96 pocillos, replicándose cada combinación experimental dos veces y en dos experimentos diferentes (diferentes placas para PCR y técnicos diferentes).

Para evaluar adicionalmente la robustez y la eficacia del protocolo de qPCR recientemente desarrollado, se evaluaron las cinco series de curvas patrón de ADN obtenidas con ADN genómico de *P. arborescens* (G1-5_L y G1-5_S, ADN de fondo de las hojas y de las semillas, respectivamente) y/o ADN del plásmido seleccionado EC3_P38ESJ (P1-5_L y P1-5_S, ADN de fondo de las hojas y de las semillas, respectivamente) en series de dos en dos (G1_{L,S}-P1_{L,S}, G2_{L,S}-P2_{L,S}, G3_{L,S}-P3_{L,S}, G4_{L,S}-P4_{L,S} y G5_{L,S}-P5_{L,S}) en la misma placa para PCR. Las amplificaciones por PCR cuantitativa de cada serie de curvas patrón de ADN incluían dos repeticiones por placa y se repitieron dos veces en experimentos independientes (placas para PCR y técnicos).

Se determinó la reproducibilidad del ensayo de qPCR en tiempo real comparando parámetros y resultados de C_T (ordenada en el origen y pendientes) de las rectas de regresión patrón obtenidas con curvas patrón de ADN G1-5_{L,S} y P1-5_{L,S} que se obtuvieron en experimentos independientes y por diferentes personas (véase el análisis de datos a continuación). Estas curvas patrón se dedujeron de muestras de ADN obtenidas a partir de hojas de adormidera de diferente edad, y de hojas y semillas de origen diferente, después de hasta 10 ciclos de congelación (-20°C)/descongelación.

Además, para determinar la sensibilidad del protocolo de qPCR en tiempo real utilizando el conjunto de cebadores P6, se usaron dos series de curvas patrón de ADN (G1-2_{W,S,L} y P1-2_{W,S,L}) para comparar el nuevo protocolo de qPCR en tiempo real específico de especie con los protocolos de PCR simple y anidada desarrollados previamente para la detección *in planta* de *P. arborescens* (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390).

7. Análisis de semillas y plantas de adormidera infectadas por *Peronospora arborescens* mediante qPCR en tiempo real

Para validar la utilidad de la técnica de qPCR en tiempo real para caracterizar la resistencia o la tolerancia a *P. arborescens* en germoplasma de adormidera, se utilizaron 50 plantas de adormidera de un estudio anterior (Montes-Borrego, M. et al. 2009; Phytopathology 99:73-81) que estaban infectadas sistémicamente por *P. arborescens* (tal como se determinó mediante el ensayo de detección de PCR anidada) pero que no mostraban ningún síntoma de enfermedad. Esas plantas se cultivaron en condiciones controladas en un suelo infestado de manera natural por *P. arborescens*, y se tomaron muestras cuando habían formado una cápsula en el tallo principal. Se extrajo ADN de un trozo de 4 a 5 cm de longitud del tallo basal de cada planta, tal como se describió anteriormente (Montes-Borrego, M. et al. 2009; Phytopathology 99:73-81) y se usó para detectar y cuantificar el nivel de infección por *P. arborescens*. En estos ensayos de qPCR en tiempo real se usaron curvas patrón de ADN G4_L y P4_L y se incluyeron en cada una de las tres placas independientes, con dos repeticiones por cada muestra de ADN.

Para validar la utilidad del protocolo de qPCR en tiempo real para cuantificar el inóculo de *P. arborescens* en semillas, se usaron muestras de ADN de un estudio anterior (Montes-Borrego, M. et al. 2009; Phytopathology 99:73-81) obtenidas de 11 lotes de semillas comerciales (tres repeticiones/lote de semillas) proporcionadas por ALCALIBER S.A. Dicha compañía seleccionó los lotes de semillas para siembras comerciales de campos comerciales del año anterior en los que no se observaron ataques de Mildiu o bien el ataque de la enfermedad se consideró bajo (de 0 a 1 planta afectada por m²; Montes-Borrego, M. et al. 2009; Phytopathology 99:73-81). Además, se extrajo ADN tal como se describió anteriormente (Landa, B. B. et al.; 2007. Phytopathology 97:1380-1390) a partir de semillas obtenidas de cápsulas de 30 plantas de adormidera elegidas aleatoriamente cultivadas en un campo con un incidencia de enfermedad de aproximadamente el 5%. De las 30 cápsulas, 19 mostraban síntomas de Mildiu de diferente severidad y 11 no tenían síntomas. En estos ensayos de qPCR en tiempo real, se usaron curvas patrón de ADN G4_S y P4_S y se incluyeron en cada una de las dos placas independientes, con dos repeticiones por cada muestra de ADN.

Se diluyó 1/2 o 1/5 veces ADN de semilla o planta de adormidera en AEU para obtener una concentración de ADN en un intervalo similar al usado en la curva patrón de ADN. Después se cuantificaron muestras de ADN de manera exacta, por triplicado,

usando el ensayo fluorométrico de amplio espectro del kit de ensayo de ADN Quant-iT, tal como se describió anteriormente y se usaron para normalizar ADN de *P. arborescens* con respecto al ADN de planta total presente en cada reacción. Se compararon los resultados de qPCR de muestras desconocidas (semillas y tallos) con los obtenidos
5 anteriormente con los ensayos de PCR simple y anidada usando el conjunto de cebadores P6 (Montes-Borrego, M. et al. 2009; Phytopathology 99:73-81). Finalmente, se estimó la cantidad de ADN del patógeno en muestras desconocidas a partir de las rectas de regresión de la serie G universales, una vez que se comprobó que las rectas de regresión patrón P4_s no diferían estadísticamente ($P \geq 0,05$) de las rectas de regresión de
10 la serie P universales (véase a continuación).

8. Análisis de datos

Se calcularon en primer lugar los valores de ciclo umbral (C_T) para cada reacción determinando el número de ciclos de PCR en el que la señal de fluorescencia supera el
15 fondo usando los criterios de estimación por defecto en el software iCycler IQ versión 3.0a (Bio-Rad). Posteriormente, con el fin de comparar y establecer relaciones entre diferentes curvas patrón de ADN generadas a partir de diferentes tratamientos, se definió manualmente la posición umbral y se fijó a la misma posición para todos los tratamientos y experimentos para comparar de manera apropiada todas las curvas patrón
20 (Vaerman, J. L. et al. 2004; J. Biol. Regul. Homeost. Agents 18: 212-214). Se calculó la eficacia de la amplificación (EA), a partir de las pendientes de las curvas patrón usando la ecuación $EA = 10^{(1/pendiente)} - 1$ (Adams, P. S. 2006. Data analysis and reporting, p. 39-62. In: M. Tevfik Dorak (ed.), Real-Time PCR. Taylor & Francis, New York).

Se realizaron regresiones lineales del logaritmo natural de concentraciones
25 conocidas del ADN diana frente a los valores de C_T para cada curva patrón de ADN usando Statistix 8.0 (Analytical Software, Tallahassee, EE.UU.). Se usaron las rectas de regresión patrón de cada placa elegida como curvas de referencia para transformar los valores de C_T experimentales en cantidades de ADN del patógeno (nanogramos). Se determinaron las diferencias estadísticas en C_T , y la eficacia de la amplificación (EA)
30 entre las rectas de regresión patrón obtenidas para las curvas G y las curvas P en diferentes fondos mediante el análisis de la varianza (ANOVA) univariable. Además, se compararon estadísticamente todas las rectas de regresión patrón obtenidas para ADN genómico de *P. arborescens* (curvas G) y ADN plasmídico (curvas P) en diferentes

fondos (W, L, y S) para determinar la homogeneidad ($P \geq 0,05$) de la varianza (prueba de Bartlett) y para determinar la igualdad de las pendientes y ordenadas en el origen usando una prueba F a $P < 0,05$.

5

RESULTADOS

1. Optimización de qPCR en tiempo real

La optimización de qPCR en tiempo real implicaba el ajuste fino paso a paso de los siguientes parámetros de PCR: selección del conjunto de cebadores (P2 frente a P3
10 frente a P6), concentración de cebadores, temperatura de hibridación y volumen final de las reacciones de PCR. Ésto se realizó usando curvas patrón de ADN (G1_W y G1_S) en dos experimentos independientes para cada conjunto de cebadores.

La reducción del volumen de reacción patrón desde 50 hasta 20 µl no tuvo efecto sobre la exactitud del ensayo (datos no mostrados). En consecuencia, se eligió un
15 volumen final de 20 µl para minimizar el coste por ensayo de qPCR en tiempo real. Ocasionalmente, en el análisis de la curva de fusión se observó que se producían picos débiles entre 60-75°C, tal como se muestra en la **Figura 1B, D**. Teóricamente, estos picos se suelen notificar como productos no específicos o dímeros de cebadores. En los presentes ensayos no se detectaron estas amplificaciones no específicas mediante
20 electroforesis en un gel de agarosa al 1,2 % (p/vol) (datos no mostrados). Para evitar la medición de esta señal de fluorescencia emitida por estas amplificaciones no específicas, se detectó la fluorescencia del amplicón diana [temperatura de fusión (T_m) = 86,5°C] a 83°C (Weng, T. et al., 2005. Anal. Biochem. 342:167–169). No se produjo fluorescencia del amplicón diana para los controles negativos usando cualquiera de los tres conjuntos
25 de cebadores a 83°C; pero ocasionalmente, los controles negativos mostraron también picos débiles entre 60-80°C, tal como se muestra en la **Figura 1B,D**.

La mezcla de reacción de PCR optimizada era similar para cada uno de los conjuntos de cebadores y contenía (volumen final de 20 µl): 1 µl de muestra de ADN, 1×
iQ SYBR Green Supermix (BioRad) y 0,3 µM de cada cebador. Las condiciones de
30 ciclado térmico consistían en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min. seguido de 35 ciclos de 1 min. a 95°C, 1 min. a 63°C, 2 min. a 72°C y 83°C durante 15 s. Se añadió una etapa de extensión final a 72°C durante 10 min. Se detectó la fluorescencia

del amplicón diana a 83°C. Se fijó una posición umbral de 400 para todos los experimentos para determinar los valores de C_T .

Tras la optimización de los ensayos de qPCR en tiempo real, se generaron rectas de regresión patrón para cada conjunto de cebadores usando un intervalo de ADN de desde 10 ng hasta 100 fg. La reproducibilidad más alta de amplificaciones se obtuvo con el conjunto de cebadores P6 (**Figura 1A,C**), para el que se constató una eficacia elevada por encima de seis órdenes de magnitud de la concentración de ADN mostrando un intervalo dinámico lineal de amplificación. Además, no se produjeron diferencias significativas ($P \geq 0,05$) para valores de C_T con el conjunto de cebadores P6 para ambos fondos de ADN ($G1_W$ y $G1_S$) y experimentos independientes; mientras que se encontraron diferencias significativas ($P < 0,0019$) en valores de C_T para los conjuntos de cebadores 2 y 3 entre experimentos independientes al menos en una de las curvas de ADN $G1_W$ y $G1_S$. Las rectas de regresión patrón obtenidas para el conjunto de cebadores P6 mostraron amplificaciones muy reproducibles, mejores eficacias y valores de coeficiente de determinación superiores ($EA = 90,6-100,3\%$; $R^2 = 0,990-0,992$) en comparación con los conjuntos de cebadores P2 ($EA = 92,2-112,3\%$; $R^2 = 0,778-0,955$) y P3 ($EA = 83,3-107,8\%$; $R^2 = 0,979-0,980$) (**Figura 2**). En consecuencia, se seleccionó el conjunto de cebadores P6 para los experimentos posteriores.

2. Reproducibilidad, eficacia y sensibilidad de PCR cuantitativa en tiempo real

El ANOVA univariable de valores de C_T derivados de curvas patrón de ADN $G1_{W,L,S}$ - $G2_{W,L,S}$ indicó la homogeneidad de varianzas ($P \geq 0,05$) así como que ni el origen de la muestra de ADN (serie de ADN G1 frente a G2) ($P = 0,9330$) ni el técnico ($P = 0,8898$) o el ADN de fondo (W, L y S) ($P = 0,8831$) influían significativamente en los resultados de qPCR en tiempo real. En consecuencia, se combinaron las cuatros series de datos de la qPCR en tiempo real obtenidas en ensayos independientes para análisis adicionales (**Tabla 2**). La eficacia y la reproducibilidad de los ensayos de qPCR en tiempo real de curvas patrón de ADN de la serie G y de la serie P se vieron afectadas positivamente por la presencia de la fuente de ADN del huésped (es decir, tejidos de las hojas y de las semillas). Por tanto, para la serie G, la exactitud y la EA de los ensayos de PCR en tiempo real fueron superiores ($0,2 < DE < 0,6$; $R^2 > 0,993$; $EA = 93,0-93,1\%$) cuando el ADN de *P. arborescens* estaba diluido en ADN de las hojas (G_L) o de las semillas (G_S) en comparación con cuando el ADN estaba diluido en agua (G_W)

($0,5 < DE < 0,8$; $R^2 = 0,978$; EA = 90,5%) (**Tabla 2; Figura 3A**). Las comparaciones estadísticas indicaron que las rectas de regresión patrón de las tres curvas diferían significativamente en la ordenada en el origen ($P < 0,0001$) pero no en las pendientes ($P = 0,7664$). De hecho, la ordenada en el origen de la recta de regresión patrón G_W era significativamente superior que la de las rectas de regresión patrón G_L y G_S , lo que indica una sensibilidad inferior con respecto a la anterior. Por tanto, no se cuantificó de manera exacta el ADN de *P. arborescens* a concentraciones inferiores a 1 pg si estaba diluido en agua (serie G_W) y se perdió el intervalo dinámico lineal de amplificación a esta concentración de patógeno. Por el contrario, pudo cuantificarse ADN de *P. arborescens* hasta 0,1 pg cuando estaba diluido en ADN de las semillas o de las hojas del huésped, y las desviaciones estándar de la repetición no aumentaron para las curvas G_L y G_S a una concentración inferior de este tipo (**Tabla 2; Figura 3A**).

Tal como se encuentra para la serie G , las rectas de regresión patrón P_W mostraron EA y reproducibilidad de amplificaciones inferiores ($0,3 < DE < 1,9$; $R^2 > 0,964$; EA > 96,1%) en comparación con la curvas P_L y P_S ($0,2 < DE < 0,5$; $R^2 > 0,990$; EA = 109,1-110,2%). Además, en consecuencia no pudo cuantificarse el ADN diana en algunas repeticiones a la concentración más alta de 10 ng debido a la inhibición de la reacción de amplificación. La comparación de rectas de regresión patrón indicó que tanto la pendiente como la ordenada en el origen de la recta de regresión patrón P_W diferían significativamente ($P < 0,001$) de las de las rectas de regresión P_L y P_S . No se produjeron diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre las rectas de regresión P_L y P_S (**Tabla 2; Figura 3B**). Puesto que el uso de fondo de ADN del huésped proporcionó resultados sumamente reproducibles y los valores de eficacia de la amplificación estaban dentro de los valores ideales para los ensayos de qPCR en tiempo real, elegimos usar curvas patrón de ADN G_L , G_S , P_L y P_S para los experimentos posteriores.

Se determinó la sensibilidad del protocolo de qPCR en tiempo real usando un conjunto de cebadores P6 para dos series de curvas patrón de ADN ($G1-2_{W,S,L}$ y $P1-2_{W,S,L}$) y se compararon los resultados con los obtenidos mediante electroforesis en gel usando los protocolos de PCR simple y anidada desarrollados anteriormente (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390; Montes-Borrego, M. et al. 2009; *Phytopathology* 99:73-81). Cuando se usaron las curvas $G1-2_{W,S,L}$, los límites de detección de PCR para los ensayos de PCR simple y anidada fueron similares a los notificados anteriormente (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390;

Montes-Borrego, M. et al. 2009; *Phytopathology* 99:73-81); amplificando la PCR anidada hasta la cantidad más baja de ADN del patógeno sometido a ensayo de 0,01 pg (**Figura 4, Tabla 2**). El límite de detección del ensayo de qPCR en tiempo real usando ADN de *P. arborescens* diluido en AEU (serie G_W) fue mayor que cuando se usó ADN de las hojas (serie G_L) o ADN de las semillas (serie G_S) del huésped. Por tanto, había una tendencia de aumento de la sensibilidad y de la detección cuando estaba presente el ADN del huésped en la reacción de amplificación (**Figura 4, Tabla 2**), tal como se mostró anteriormente para los protocolos de PCR simple y anidada (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390; Montes-Borrego, M. et al. 2009; *Phytopathology* 99:73-81). El límite de detección de qPCR en tiempo real fue de 0,10 pg de ADN de *P. arborescens* para G1-2_W y de 0,01 pg para las curvas G1-2_{S,L}, tal como se determinó mediante la señal de fluorescencia del amplicón, pero la banda de ADN amplificado apenas podía discernirse mediante electroforesis en gel a las concentraciones de ADN del patógeno (**Figura 4, Tabla 2**). El uso del protocolo de detección de qPCR en tiempo real con curvas patrón de ADN construidas de manera independientemente o mediante diferentes técnicas no influyó en la reproducibilidad ni en la coherencia de los resultados (**Tabla 2**). Cuando se usaron las curvas P1-2_{W,S,L} de ADN de plásmido, el límite de detección para el ensayo de qPCR en tiempo real aumentó en dos (serie P_W) o en tres (serie P_{L,S}) órdenes de magnitud en comparación con los obtenidos con sus respectivas curvas de ADN de la serie G. En todos los casos, pudo cuantificarse de manera exacta hasta 0,001 pg de ADN de plásmido (aproximadamente 233 copias de inserto) aunque la serie P_W mostró resultados menos reproducibles ($DE > 1,9$) (**Tabla 2**).

3. Desarrollo de un modelo universal para cuantificar ADN de *P. arborescens* en tejidos vegetales

El protocolo de qPCR en tiempo real recientemente desarrollado es sumamente reproducible y preciso tal como se indica por el ANOVA univariable de valores de C_T derivados de 10 experimentos independientes para cada una de las series G o P [cinco curvas patrón de ADN independientes (**Tabla 1**) cada una procesada dos veces por técnicos independientes]. Por tanto, había homogeneidad de las varianzas ($P \geq 0,05$) y ni el origen de la muestra de ADN ($P = 0,9990$ y $P = 0,9724$ para las series G o P, respectivamente) ni el técnico ($P = 0,9759$ y $P = 0,9467$ para las series G o P, respectivamente) o el ADN de fondo (L y S) ($P = 0,7934$ y $P = 0,8558$ para las series G

o P, respectivamente) influyeron significativamente en los resultados de los ensayos de qPCR en tiempo real. Todas las rectas de regresión patrón mostraron alta eficacia y reproducibilidad de amplificaciones, oscilando los valores de EA desde el 89,6 hasta el 99,6% para la serie G, y desde el 95,7 hasta el 111,1% para la serie P, y las desviaciones estándar de los C_T fueron inferiores a 0,5 en casi todos los casos (**Figura 5A**). Además, la comparación de las 10 rectas de regresión patrón para cada una de G o P no mostró diferencias significativas entre las pendientes ($P = 0,3243$ y $P = 0,1962$ para la serie G y la serie P, respectivamente) y las ordenadas en el origen ($P = 0,0998$ y $P = 0,3366$ para la serie G y la serie P, respectivamente) de las rectas de regresión. En consecuencia, para obtener un modelo de regresión robusto y universal se combinaron las 10 series de datos de la qPCR en tiempo real obtenidas independientemente para cada serie de ADN G o P y se usaron para ajustar un modelo de regresión simple para cada una de las series G o P (**Figura 5B**), es decir, el modelo de regresión patrón de G y el modelo de regresión patrón de P, respectivamente. Con este modelo de ecuación de regresión pueden validarse los datos de cada experimento o placa usando sólo la curva patrón de ADN de la serie P. Por tanto, puede determinarse estadísticamente ahora si las pendientes y las ordenadas en el origen de la recta de regresión patrón de P para cada experimento no difieren estadísticamente ($P \geq 0,05$) de las del modelo de ecuación de regresión patrón de P, y entonces se supone que lo mismo se produciría para una supuesta recta de regresión patrón de G frente al modelo de ecuación de regresión patrón de G. Para validar esto hemos incluido además una curva patrón de ADN de la serie G en cada experimento y hemos comparado las dos rectas de regresión. Entonces pueden estimarse las concentraciones logarítmicas de ADN_G sustituyendo directamente los valores de C_T en el modelo de ecuación de regresión patrón de G (véase a continuación).

25

4. Validación del modelo de regresión y cuantificación de ADN de *P. arborescens* en tejidos vegetales

No hubo diferencias significativas ($P > 0,405$) entre las pendientes y las ordenadas en el origen de las rectas de regresión G_{4L} , G_{4S} y P_{4L} , P_{4S} para las placas para PCR independientes usadas para la cuantificación del ADN de *P. arborescens* en tejidos vegetales en cada uno de los diferentes experimentos realizados. En consecuencia, se reunieron los datos de la qPCR en tiempo real obtenidos en placas independientes y se adaptaron las rectas de regresión individuales para las series G_{4L} , G_{4S} y P_{4L} , P_{4S} dentro

30

de cada experimento (**Figura 6A, Figura 7A**). La comparación de las rectas de regresión $P4_L$ y $P4_S$ frente al modelo de ecuación de regresión de serie P universal indicó que no hubo diferencias significativas entre las pendientes ($P > 0,2061$) y las ordenadas en el origen ($P > 0,1035$). Por tanto, se podía lanzar la hipótesis de que se habrían
5 obtenido resultados similares para las rectas de regresión $G4_L$ y $G4_S$ frente al modelo de ecuación de regresión de serie G universal si no estuviera disponible ADN genómico de *P. arborescens* para construir una curva patrón de ADN de serie G. Esto se demostró adicionalmente por la falta de diferencias significativas entre las pendientes ($P > 0,0905$) y las ordenadas en el origen ($P > 0,0771$) cuando se compararon estadísticamente las
10 rectas de regresión $G4_L$ y $G4_S$ con el modelo de ecuación de regresión de serie G universal. Por tanto, ahora está validada la utilidad de usar los modelos de ecuación de regresión de serie P y serie G universales para cuantificar el ADN de *P. arborescens* en tejidos vegetales, y pueden estimarse las concentraciones logarítmicas de ADN_G , sustituyendo directamente los valores de C_T en el modelo de ecuación de regresión
15 patrón de G una vez que se ha validado el experimento con una curva patrón de ADN de serie P y su correspondiente modelo de regresión.

El uso del protocolo de qPCR en tiempo real permitió la detección de ADN de *P. arborescens* en el 68,2% de las muestras de tallo de 22 plantas de adormidera asintomáticas que se demostraron infectadas sistémicamente con *P. arborescens*
20 mediante ensayos de PCR anidada en un trabajo anterior (**Figura 6**; Montes-Borrego, M. et al. 2009; Phytopathology 99:73-81). El patógeno no pudo cuantificarse con el ensayo de qPCR en tiempo real en aquellas muestras de tallos que mostraron una amplificación débil en el ensayo de PCR anidada (*datos no mostrados*). La cantidad de ADN de *P. arborescens* en las muestras de ADN del tallo de plantas asintomáticas fue muy variable,
25 oscilando desde 0,110 ppm hasta 5.557 ppm (5,6‰) (**Figura 6B**).

El uso del protocolo de qPCR en tiempo real permitió la detección de ADN de *P. arborescens* en el 100% de los lotes de semillas comerciales y en el 97,0% de las muestras de semillas analizadas, y cuantificar una biomasa de patógeno de tan solo 1,2 pg de ADN diana por microgramo de ADN de semilla (**Figura 7B**), que corresponde al
30 0,0013‰ de *P. arborescens* en el ADN de *P. somniferum*. El nivel de detección del patógeno en las muestras de semillas mediante ensayos de qPCR en tiempo real se correlacionó con el encontrado en los ensayos de detección anteriores de aquellas muestras de semillas usando ensayos de PCR simple o anidada (Landa, B. B. et al.;

2007. *Phytopathology* 97:1380-1390, Montes-Borrego, M. et al. 2009; *Phytopathology* 99:73-81). La cantidad de ADN de *P. arborescens* osciló desde el 0,074 hasta el 0,0013‰ (**Figura 7B**), del 0,0004 al 0,091‰ (**Figura 7C**) y del 0,05 al 1,275‰ (**Figura 7D**) en las muestras de semillas que produjeron respectivamente amplificaciones nulas, débiles, o positivas, en el ensayo de PCR simple; y amplificaciones débiles, positivas o positivas, en los ensayos de PCR anidada, respectivamente. En los lotes de semillas altamente infestados (por ejemplo, número 923, **Figura 7D**) *P. arborescens* representó como máximo el 0,077% en ADN de *P. somniferum* lo que representa aproximadamente 0,256 mg de ADN de *P. arborescens* por kg de semillas. La cantidad de patógeno dentro de un lote de semillas varió entre las tres muestras independientes sometidas a ensayo, lo que indica la necesidad de realizar varias repeticiones por lote de semillas para conseguir una cuantificación de patógenos exacta (**Figura 7**).

Finalmente, el uso del protocolo de qPCR en tiempo real para el ensayo de las muestras de semillas de 30 cápsulas individuales (11 asintomáticas, 6 con síntomas leves de Mildiu y 13 con esporulación patógena evidente) de adormidera cultivada en campo permitió la detección de *P. arborescens* en el 70,0% (21/30) de todas las muestras sometidas a ensayo y en el 36,4% (4/11) de las cápsulas asintomáticas. En las muestras de semillas de las cápsulas asintomáticas en las que podía cuantificarse el patógeno, *P. arborescens* representó el 0,0003-0,007‰ en el ADN de *P. somniferum*. Por otra parte, en las cápsulas sintomáticas, *P. arborescens* representó el 0,006-0,61‰ (cápsulas son síntomas leves) o el 0,12-2,53% (cápsulas con esporulación patógena) en el ADN de *P. somniferum* (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

En los últimos años, se han desarrollado protocolos de PCR específicos de especie usando cebadores que seleccionan como diana la región ITS del ADNr para diagnosticar cualquiera de los dos patógenos causantes del Mildiu de la adormidera descritos en la bibliografía, *P. arborescens* y *P. cristata*, pero los métodos publicados no son cuantitativos (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390, Montes-Borrego, M. et al. 2009; *Phytopathology* 99:73-81, Scott, J. B. et al. 2004. *Mycol. Res.* 108:198-295). El objetivo general de esta investigación fue el desarrollo de un método de cuantificación exacto de *P. arborescens* en tejidos vegetales y lotes de semillas

comerciales usando la tecnología de la PCR cuantitativa en tiempo real que permitiría una mejor comprensión de la biología de este biotrofo obligado estricto y su interacción en la planta huésped.

Para la presente investigación, resultó vital considerar cada fase del protocolo experimental, comenzando con los procedimientos y la organización del laboratorio a través de la adquisición de muestras, la preparación de secuencias del ADN dianas (tanto curvas patrón de ADN como muestras de prueba), y finalmente la etapa de la qPCR en tiempo real. En dicho estudio fue posible obtener datos cuantitativos muy fiables y un ensayo de qPCR en tiempo real robusto, dado que cada una de estas fases se validaron apropiadamente. La detección y la cuantificación exacta y fiable de una secuencia diana mediante qPCR necesita un proceso de optimización estricto dado que depende de varios factores incluyendo linealidad, precisión, especificidad, sensibilidad, eficacia de la amplificación, calidad del ADN genómico que va a cuantificarse y exactitud de las curvas patrón de ADN, entre otros (Wong, M. L. et al. 2005. BioTechniques 39:75-85).

Se resolvieron los problemas de inespecificidad del reactivo SYBR Green I, que se une a cualquier ADN bicatenario, mediante el uso del conjunto de cebadores altamente específicos P6 (Landa, B. B. et al.; 2007. Phytopathology 97:1380-1390, Montes-Borrego, M. et al. 2009; Phytopathology 99:73-81) y mediante la cuantificación del amplicón diana a una T_m de 83°C a la que se desnaturalizarían los posibles productos no específicos y sólo se cuantifica la emisión fluorogénica del amplicón diana (Silvar, C. et al. 2005. Phytopathology 95: 1423-1429). Además, esto se realizó sin reducir la eficacia de la amplificación de las reacciones tal como se describe en otras situaciones experimentales (Weng, T. et al. 2005. Anal. Biochem. 342:167-169). Adicionalmente, tras el ciclo de amplificación final, el perfil de temperaturas de la curva de fusión y el análisis de electroforesis en gel confirmaron que sólo se amplificó un producto de la PCR en las muestras con el ADN genómico de *P. arborescens* y no se obtuvo ningún producto de amplificación en los controles negativos (ADN del huésped o agua).

Para la cuantificación absoluta en los ensayos de qPCR en tiempo real, la exactitud de la cuantificación de muestras desconocidas depende enteramente de la exactitud de las curvas patrón de ADN (Vaerman, J. L. et al. 2004. J. Biol. Regul. Homeost. Agents 18: 212-214). Cuando se desarrollan protocolos de qPCR en tiempo real, la técnica usada más comúnmente para medir la concentración de ácido nucleico es la determinación de la absorbancia a 260 nm, dado que es fácil de realizar, económica y

permite una comprobación rápida de la pureza del ADN (razón de 260/280 nm). Las principales desventajas de este método son la sensibilidad relativa inferior del ensayo y la interferencia con ARN, ADNs, o contaminantes y nucleótidos individuales que pueden contribuir a la señal (Rengarajan, K. et al. 2002. Mol. Vision 8:416-21). Como alternativa, algunos colorantes fluorescentes, tal como el presente en el kit usado en la presente invención, son altamente selectivos para ADNds frente al ARN, su señal de fluorescencia no resulta afectada por muchos contaminantes comunes y proporciona un aumento de la sensibilidad lo que amplía el intervalo de detección significativamente en comparación con la determinación de la absorbancia; una desventaja es el aumento del coste de la técnica.

Creemos que uno de los motivos para la alta reproducibilidad, precisión y exactitud del método de la presente invención fue el especial cuidado que se tuvo para conseguir concentraciones exactas de ADN de plásmido y patógeno para construir las curvas patrón de ADN. Ésto se llevó a cabo mediante la cuantificación de cada muestra de ADN con el kit de ensayo de ADN Quant-iT por triplicado, en dos microplacas independientes y usando controles internos de cuantificación de ADN en cada ensayo. Podrían obtenerse resultados similares usando otros kits y colorantes de ADN de intercalación fluorescente tras los ajustes apropiados (Rengarajan, K. et al. 2002. Mol. Vision 8:416-21). Adicionalmente, otra ventaja de dicho kit fue que se pudo introducir una etapa de normalización final en el ensayo ya que se dedujo la razón del ADN del patógeno (cuantificado mediante el ensayo de qPCR en tiempo real) para el ADN del huésped en cada muestra de prueba (cuantificado anteriormente mediante fluorescencia) ajustando la variación introducida por las diferencias de una muestra a otra en la extracción del ADN; además, ésto evitó el coste de cuantificar el ADN del huésped mediante ensayos de qPCR adicionales (Gachon, C., y P. Saindrenan. 2004. Plant Physiol. Biochem. 42:367-371).

Otro motivo probable para la alta reproducibilidad, precisión y exactitud del método de la invención fue la forma en que se calcularon los ciclos umbrales (C_T). En la mayoría de los ensayos de qPCR en tiempo real desarrollados para cuantificar patógenos de plantas no se facilita información con respecto al cálculo de la posición umbral o normalmente se calcula mediante el software del equipo. En la actualidad, muchos instrumentos calculan automáticamente el mejor nivel inicial para cada reacción-experimento proporcionando individualmente de esta manera los C_T más exactos para

cada placa. Los C_T constituyen la base de cualquier ensayo de qPCR en tiempo real ya que se usan para determinar los números de copia. Sin embargo, dado que los C_T se definen basándose en la posición umbral y la fluorescencia de fondo no es un valor constante o absoluto, ya que está influida por las condiciones de reacción cambiantes, calcular un umbral diferente para cada tratamiento o placa podría dar como resultado un error, especialmente cuando se intentan combinar diferentes placas para un único experimento (Bustin, S. A., y Nolan, T. 2004. J. Biomol. Tech. 15:155-166). Por tanto, en la presente invención, se incluyó una curva patrón de ADN en cada microplaca cuando se realiza un ensayo de qPCR en tiempo real, y la posición umbral se definió y se fijó manualmente, tras la validación apropiada, en la misma posición para que todos los tratamientos y experimentos pudieran comparar placas independientes y combinar los resultados tras la verificación adecuada de resultados estadísticamente similares ($P \geq 0,05$). La posición se escogió partiendo de la base del establecimiento de un compromiso de detección de los C_T en la fase exponencial de la reacción y evitando al mismo tiempo la fluorescencia de fondo (Bustin, S. A., y Nolan, T. 2004. J. Biomol. Tech. 15:155-166).

En la presente invención, la EA, la sensibilidad y la reproducibilidad de las reacciones de qPCR de ambas curvas patrón de ADN de la serie G y de la serie P resultó positivamente afectada por la presencia de ambos tipos de ADN del huésped (de los tejidos de las hojas y de las semillas). Por tanto, hubo una tendencia de obtener mayor sensibilidad cuando estaba presente el ADN del huésped en la reacción, tal como se demostró anteriormente por el protocolo de la PCR simple y anidada. Otros estudios han encontrado una reducción (Li, W. et al. 2007. Plant Dis. 91:51-58) o no han encontrado ninguna diferencia (Atallah, Z. K. et al. 2007. Phytopathology 97:865-872) en la EA, la exactitud y el límite de detección cuando se usa un ADN de fondo de tejidos vegetales del huésped en los ensayos de qPCR. Sin embargo, la mayoría de los estudios no evaluaron la influencia del ADN del huésped en estos parámetros del ensayo de qPCR (por ejemplo, Hukkanen, A et al. 2006. Eur. J. Plant Pathol. 116:225-235). Se ha notificado que a bajas concentraciones del ADN diana, se favorece la formación de dímeros de cebador disminuyendo la sensibilidad y produciendo sesgos de las curvas patrón, y también que el ADN puede adherirse al depósito de plástico, por lo que la adición de parte del ADN de matriz del huésped o foráneo a la mezcla de qPCR puede

minimizar la pérdida de ADN diana (Atallah, Z. K. et al. 2007. *Phytopathology* 97:865-872).

Dado que la variación experimental es inevitable, es importante validar los resultados de un ensayo de qPCR midiendo la variación dentro de un ensayo y entre
5 ensayos. La mayoría de los estudios estiman la variación usando valores de C_T únicamente, cuando ésta probablemente no es la forma más apropiada puesto que éstas son unidades logarítmicas y falsearán la variabilidad real (Wong, M. L. et al. 2005. *BioTechniques* 39:75-85). En la presente invención se compararon estadísticamente ambos parámetros de las rectas de regresión patrón (pendientes y ordenadas en el origen)
10 obtenidos tanto para las curvas patrón de ADN genómico de *P. arborescens* (serie G) como para las del ADN de plásmido (serie P) y para los diferentes fondos (ADN de las hojas y de las semillas. En la presente invención, el ANOVA univariable de los valores de C_T y la comparación estadística entre las pendientes y las ordenadas en el origen de las rectas de regresión patrón derivadas de 10 experimentos independientes indicaron
15 una alta precisión y reproducibilidad, lo que demuestra la alta fiabilidad de nuestro ensayo de qPCR en tiempo real. Todas las rectas de regresión patrón mostraron alta eficacia y reproducibilidad de las amplificaciones, con bajas desviaciones estándar de los C_T , oscilando los valores de EA desde el 89,6 hasta el 111,1% para las series G y P, y un intervalo dinámico lineal sobre 6 órdenes de magnitud superando los valores de R^2 0,99.
20 Además, el análisis estadístico de las diez curvas patrón de ADN independientes obtenidas usando diferentes fuentes de ADN del patógeno y de plantas (**Tabla 1**), incluyendo hojas y semillas de adormidera de diferente origen y diferente edad, esporangios de *P. arborescens* procedentes de hojas en esporulación en la cámara de cultivo o en el campo, diferentes cultivos de plásmidos, etc., indicó que ni el origen de la
25 muestra de ADN, ni el ADN de fondo (ADN de las hojas y de las semillas) ni el técnico que realiza el experimento influyeron significativamente en los resultados de la qPCR en tiempo real, lo que validó de nuevo la robustez de nuestro ensayo de qPCR en tiempo real. Esto permitió fijar modelos de ecuación de regresión individuales para cada una de las series G o P (**Figura 5B**). Con estos modelos de ecuación de regresión, pueden
30 validarse los datos de los experimentos usando sólo la curva patrón de ADN de la serie P basándose en el ADN de plásmido que contiene el gen diana de *P. arborescens*. Ésto permitió establecer un protocolo universal para cuantificar *P. arborescens* en tejidos de adormidera, puesto que la curva patrón de ADN de la serie P puede construirse y

almacenarse durante un periodo de tiempo prolongado sin perder exactitud en la cuantificación y, lo que es más importante, puede intercambiarse con diferentes laboratorios lo que facilita el uso del método de la invención a una escala mayor y por laboratorios diferentes.

- 5 La mayoría de los estudios en la bibliografía realizan un único o pocos experimentos para la optimización del ensayo de qPCR en tiempo real y muestran resultados de sólo una única recta de regresión patrón para el ADN del patógeno diluido en agua o el ADN del huésped (por ejemplo, Atallah, Z. K. et al. 2007. *Phytopathology* 97:865-872). Probablemente, tal como indican algunos autores (Bustin, S. A., y Nolan, 10 T. 2004. *J. Biomol. Tech.* 15:155-166) resulta valioso y necesario comenzar a introducir más procedimientos de análisis y notificación convencionales para el análisis de qPCR en tiempo real, tal como se ha realizado para la tecnología de micromatrices en el establecimiento de las directrices de MIAME (www.mged.org/miame). Ciertamente, en ausencia de tales patrones para la qPCR en tiempo real, los autores no pueden garantizar 15 que el trabajo experimental que incluye esta tecnología está validado apropiadamente y que cualquier conclusión se soporta rigurosamente por los datos reales, con el fin de reproducirse en otros laboratorios.

- Una de las principales características del método de la invención usando el conjunto de cebadores P6 fue su alta sensibilidad ya que podían detectarse fácilmente 20 hasta 10 fg de ADN de *P. arborescens* en 40 ng de ADN del huésped sin perder exactitud. Comparando con otros métodos, la sensibilidad del nuevo método de qPCR usando este conjunto de cebadores fue intermedia entre los protocolos de PCR simple (10 pg) y de PCR anidada (1 fg) desarrollados anteriormente (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390, Montes-Borrego, M. et al. 2009; *Phytopathology* 99:73- 25 81) usando el mismo conjunto de cebadores. Resulta interesante que el método de la invención por qPCR mostró una sensibilidad superior a la notificada para otros ensayos de qPCR usando sondas Taq Man para cuantificar *Plasmopara viticola* en hojas de *Vitis vinifera* (Valsesia, G. et al. 2005. *Phytopathology* 95:672-678) o cuatro especies de *Phytophthora* (*Phytophthora ramorum*, *Ph. kernoviae*, *Ph. quercina* y *Ph. citricola*) en 30 diferentes especies de plantas (Schena, L. et al. 2004. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 893-908), o usando SYBR Green I para cuantificar *P. sparsa* en *Rubus* spp. (Hukkanen, A et al. 2006. *Eur. J. Plant Pathol.* 116:225-235), *Alternaria brassicae* en semillas de crucífera (Guillemette, T. et al. 2004. *Plant Dis.* 88:490-496), *Ph. capsici* en genotipos

de pimiento (Silvar, C. et al. 2005. *Phytopathology* 95: 1423-1429) y *Verticillium dahliae* en líneas de patata (Atallah, Z. K. et al. 2007. *Phytopathology* 97:865-872), o usando cebadores Scorpion para cuantificar *Ph. nicotianae* y *Ph. citrophthora* en raíces de cítricos (Ippolito, A. et al. 2004. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:833-843). Este nivel superior de sensibilidad puede deberse al hecho de que el conjunto de cebadores P6 se desarrolló en las regiones de ITS del ADNr, lo que se produce en múltiples copias (por ejemplo, 414 ± 12 copias por genoma haploide en *Ph. infestans*); sin embargo, algunos de los estudios hacían referencia a los cebadores usados anteriormente que seleccionan como diana el mismo gen (Ippolito, A. et al. 2004. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:833-843).

Las principales ventajas de la alta sensibilidad del método de la invención fue que el método podía detectar y cuantificar la biomasa de patógeno en muestras infestadas de manera natural complejas a partir de múltiples orígenes, incluyendo semillas de cápsulas asintomáticas y lotes de semillas comerciales así como de plantas de adormidera asintomáticas infectadas sistémicamente por *P. arborescens*. Los Mildius están entre las enfermedades más destructivas de los cultivos en todo el mundo y puede transportarse por las semillas. En consecuencia, deben realizarse esfuerzos para evitar la introducción de semillas infectadas en zonas en las que no se produce el patógeno. Aunque se ha documentado la presencia de *Peronospora* spp. en lotes de semillas comerciales mediante el uso de ensayos de PCR tradicionales o específicos (Belbahri, L. et al. 2005. *Mycol. Res.* 109:1276-1287), hasta ahora no se ha desarrollado ningún estudio con ensayos de qPCR en tiempo real para cuantificar *Peronospora* spp. en semillas, tal como se ha realizado para otros hongos patógenos de plantas (Guillemette, T. et al. 2004. *Plant Dis.* 88:490-496). Recientemente, se ha demostrado que *P. arborescens* puede transmitirse por las semillas (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390) y que el patógeno puede detectarse en lotes de semillas comerciales recogidas de cultivos de adormidera que o bien no tienen evidencia o bien tienen baja incidencia de la enfermedad (Montes-Borrego, M. et al. 2009; *Phytopathology* 99:73-81). En la presente invención se ha demostrado que la cantidad de ADN de *P. arborescens* en lotes de semillas comerciales puede oscilar desde el 0,0013% hasta el 1,275% en ADN de *P. somniferum* y que representa hasta 0,256 mg de ADN de *P. arborescens* por kg de semillas. También se ha demostrado que *P. arborescens* puede detectarse en las semillas obtenidas de cápsulas asintomáticas representando el 0,006-0,61% de ADN de *P. somniferum*. Este hecho es particularmente importante para las compañías oficialmente

autorizadas para el cultivo de adormidera, como ALCALIBER S. A., y puede explicar el hecho de que incluso seleccionando lotes de semillas para las siembras del siguiente año de aquellos campos en los que no se ha demostrado ningún síntoma de la enfermedad, la enfermedad de Mildiu se ha extendido, no obstante, rápidamente a grandes zonas en las
5 que la adormidera no se había cultivado anteriormente.

La mayoría de los protocolos de qPCR en tiempo real desarrollados para cuantificar patógenos de plantas se desarrollaron o se usan con tejidos sintomáticos del huésped (Hukkanen, A et al. 2006. Eur. J. Plant Pathol. 116:225-235, Valsesia, G. et al. 2005. Phytopathology 95:672-678), y sólo algunos han notificado la capacidad de
10 cuantificar el patógeno en respuestas a la enfermedad de baja severidad o asintomáticas (Silvar, C. et al. 2005. Phytopathology 95: 1423-1429). La adormidera cv. Nigrum en la que se han establecido infecciones sistémicas asintomáticas se considera tolerante al Mildiu (F. J. Muñoz-Ledesma, *comunicación personal*), en consecuencia los presentes resultados también serían de gran interés para la detección de resistencia, puesto que la
15 falta de síntomas no garantiza que la infección no tenga lugar.

Para concluir, se puede mencionar que el método de la invención desarrollado para identificar y cuantificar *P. arborescens* en diferentes tejidos vegetales y lotes de semillas será de gran importancia en relación con la comprensión y la gestión de la epidemiología de esta enfermedad de Mildiu puesto que puede proporcionar la
20 información requerida para determinar la necesidad y o el grado de estrategias de control apropiadas incluyendo esquemas de cuarentena y certificación y también para evaluar nuevas variedades de adormidera para determinar su respuesta frente a *P. arborescens*.

TABLA 1. Fuentes de ADN de *Peronospora arborescens* y *Papaver somniferum* usadas para construir las diferentes series de curvas patrón de ADN usadas en este estudio

Fuente de ADN ^a	Serie de ADN ^b				
	1	2	3	4	5
<i>Peronospora arborescens</i>					
Genómico	ADN fresco extraído de micelio congelado (-80°C). muestra P98CSJ-2004, "Casilla San José" Écija, Sevilla, España	ADN fresco extraído de micelio fresco, muestra C79CHO-2008. "Ruidero" Écija, Sevilla, España	ADN congelado (-20°C) de la muestra C85EX-2007. experimentos en cámara de cultivo	ADN fresco extraído de micelio fresco, muestra C168EX-2008, experimentos en cámara de cultivo	ADN congelado (-20°C) de la muestra C85EX-2007 de la serie 3
Plásmido	ADN fresco extraído del clon EC3_P38ESJ en junio de 2008	ADN de plásmido congelado (-20°C) de la serie 1	ADN fresco extraído del clon EC3_P38ESJ en septiembre de 2008	ADN de plásmido congelado (-20°C) de la serie 3	ADN de plásmido congelado (-20°C) de la serie 1
<i>Papaver somniferum</i> cv. Nigrum					
Hojas	ADN fresco extraído de hojas de plántula germinadas en placas Petri. lote semillas L1	ADN congelado (-20°C) de plántulas de la serie 1	ADN fresco extraído de hojas maduras de plantas en experimentos en cámara de cultivo. lote semillas L2	ADN congelado (-20°C) de hojas maduras de la serie 3	ADN congelado (-20°C) de plántulas de la serie 1
Semillas	ADN fresco extraído del lote de semillas comercial S2, ALCALIBER S.A., 2007	ADN fresco extraído del lote de semillas comercial S2, ALCALIBER S.A., 2007	ADN congelado (-20°C) del lote de semillas D200 del experimento en cámara de cultivo, 2007	ADN congelado (-20°C) del lote de semillas D205 del experimento en cámara de cultivo, 2007	ADN congelado (-20°C) de lote de semillas D205 del experimento en cámara de cultivo, 2007

Leyenda Tabla 1

^a El ADN genómico de *P. arborescens* y de las semillas y hojas de la adormidera se extrajo usando el kit de extracción de ADN genómico de plantas “G-Spin™ IIp” y el Fast Prep System Bio 101 según Landa *et al.* El ADN de plásmido de la cepa de *E. coli* JM109 se extrajo con el kit QuickGene Plasmid usando el dispositivo QuickGene-Mini80 según las instrucciones del fabricante.

^b Se obtuvieron cinco series de curvas patrón de ADN a partir de diluciones de 10 veces [1:1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ y 1:10⁶] de ADN genómico de *P. arborescens* (1 ng/μl) o de ADN de plásmido (1 ng/μl; equivalente a 2,33 x 10⁸ copias/μl) en AEU (Curvas G_w y P_w) así como en un fondo fijo de ADN de *Pap. somniferum* (40 ng/μl) extraído de las hojas (Curvas G_L y P_L) o de las semillas (Curvas G_s y P_s) sanas de adormidera.

TABLA 2. Sensibilidad de cebadores específicos de *Peronospora arborescens* usados en ensayos de PCR anidada, simple y de PCR cuantitativa (qPCR) usando ADN purificado de *P. arborescens* individualmente o mezclado con ADN del huésped

Protocolo de PCR ^a	CP de ADN ^b	ADN ng/μl ^b	ADN de <i>Peronospora arborescens</i> (pg/μl) ^b						Control negativo	
			1.000	100	10	1	0,1	0,01		0,001
Simple	G _W	0	+/+	+/+	±/±	-/-	-/-	-/-	np	-/-
	G _L	40	+/+	+/+	+/+	+/±	-/-	-/-	np	-/-
	G _S	40	+/+	+/+	+/+	±/±	-/-	-/-	np	-/-
Cuantitativa	G _W	0	+/+	+/+	+/+	±/-	±/-	-/-	np	-/- na
	G _L	40	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	±/±	np	-/- na
	G _S	40	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	±/±	np	-/- na
	P _W	0	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	±/-	-/-	-/- na
	P _L	40	+/+	+/+	+/+	+/+	+/±	+/+	±/-	-/- na
	P _S	40	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	±/-	-/- na
Anidada	G _W	0	+/+	+/+	+/+	+/+	+/±	+/±	np	-/-
	G _L	40	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	np	-/-
	G _S	40	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	np	-/-

Leyenda Tabla 2

^a Se usaron cebadores OMPac7fw/OMPac7rv (conjunto P6) en protocolos de PCR simple y anidada tal como se describió anteriormente (Landa, B. B. et al.; 2007. *Phytopathology* 97:1380-1390, Montes-Borrego, M. et al. 2009; *Phytopathology* 99:73-81) o en un ensayo de PCR cuantitativa (este estudio).

^b Se obtuvieron cuatro curvas patrón (CP) de ADN independientes mediante diluciones en series de ADN de *P. arborescens* (1 ng/μl; serie G) o ADN del plásmido EC3_P38ESJ (1 ng/μl; serie P) que contenían la región ITS del patógeno, para obtener desde 1 ng hasta 10 fg de ADN por reacción de qPCR en agua destilada estéril (G_w y P_w; 0 ng de ADN de fondo) o en ADN de *Pap. somniferum* extraído de las hojas (G_L y P_L; 40 ng de ADN de fondo) o de las semillas (G_L y P_L; 40 ng de ADN de fondo) para investigar cualquier posible influencia del ADN del huésped en la amplificación del ADN del patógeno. Los resultados mostrados se obtuvieron para dos series y por dos técnicos independientes con las mismas series de dilución. + = Amplificación positiva; ± = Amplificación débil positiva; - = Sin señal; na = sin amplificación (es decir, los valores de C_T estaban bajo un valor de fluorescencia umbral de 400); np = no realizado. Los números mostrados en los ensayos de PCR cuantitativa corresponden a ocho valores de C_T ± la desviación estándar de dos CP independientes, realizada cada una por dos técnicos independientes y con dos repeticiones dentro de cada placa.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la cuantificación de *Peronospora arborescens* por PCR
5 cuantitativa en una muestra biológica, que comprende:
 - (i) extracción del ADN contenido en dicha muestra biológica; y
 - (ii) amplificación del ADN extraído en la etapa (i) mediante PCR cuantitativa con los oligonucleótidos identificados por las secuencias SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica es una muestra de material vegetal, o una muestra de estructuras de *P. arborescens*.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dicha muestra de material vegetal se
15 selecciona entre tejidos de semillas, cubiertas de semillas, hojas, tallos, cápsulas, raíces y mezclas de las mismas.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra biológica está infectada por *P. arborescens*.
- 20 5. Método según la reivindicación 2, en el que dicha muestra de estructuras de *P. arborescens* contiene micelio, esporangios, esporangióforos u oosporas.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra
25 biológica procede de *Papaver somniferum*.
7. Empleo de una pareja de oligonucleótidos SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 en una reacción de amplificación por PCR cuantitativa para cuantificar la presencia de *Peronospora arborescens* en una muestra biológica.

8. Empleo de la pareja de oligonucleótidos según la reivindicación 7, en el que dicha muestra biológica es una muestra de material vegetal, o una muestra de estructuras de *P. arborescens*.

5 9. Empleo de la pareja de oligonucleótidos según la reivindicación 7, en el que dicha muestra biológica es (i) una muestra de material vegetal, o (ii) una muestra de estructuras de *P. arborescens*.

10 10. Empleo según la reivindicación 8, en el que dicha muestra de material vegetal se selecciona entre tejidos de semillas, cubiertas de semillas, hojas, tallos, cápsulas, raíces y mezclas de las mismas.

15 11. Empleo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicha muestra biológica está infectada por *P. arborescens*.

12. Empleo según la reivindicación 8, en el que la muestra de estructuras de *P. arborescens* contiene micelio, esporangios, esporangióforos u oosporas.

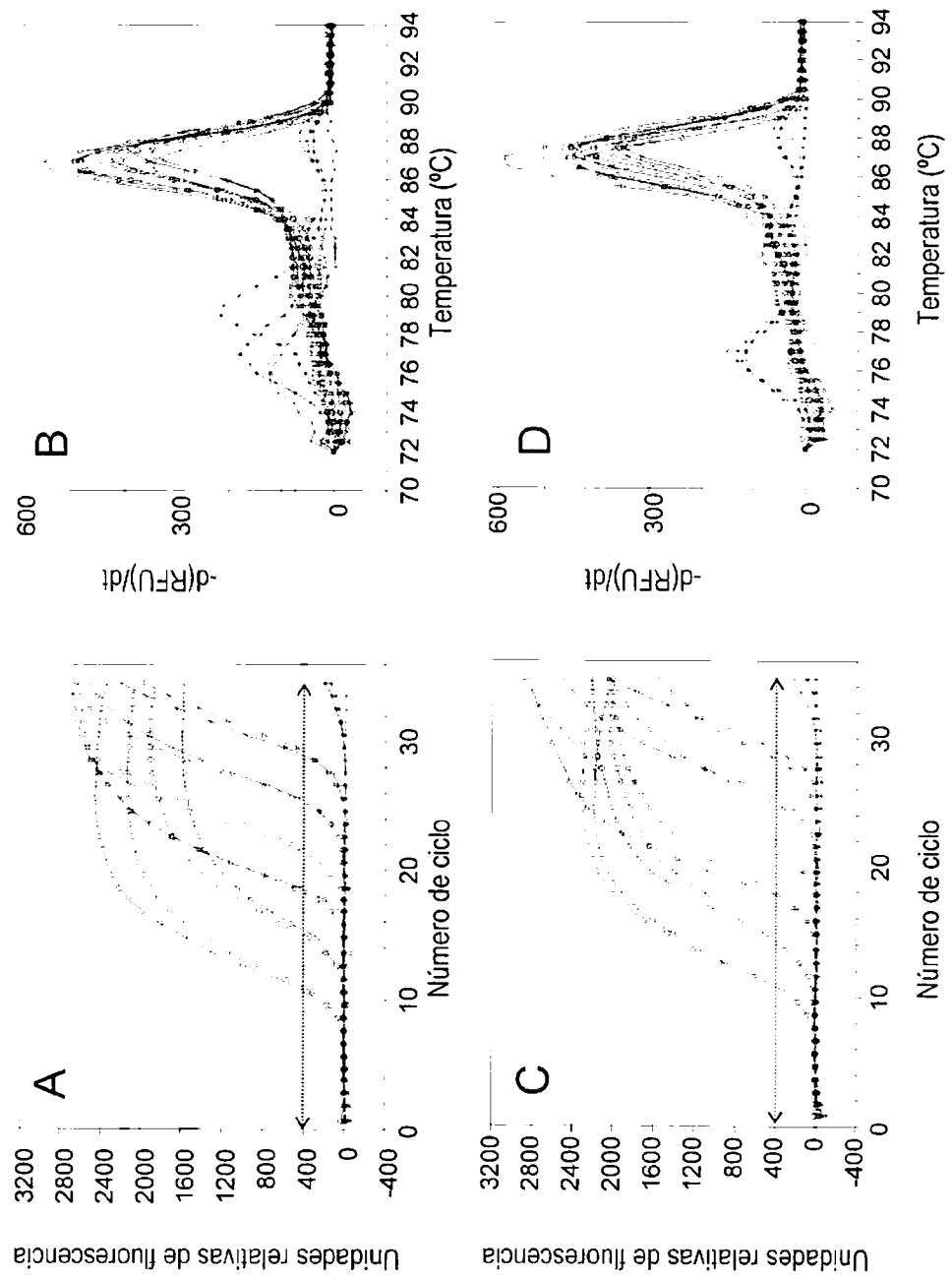


Figura 1

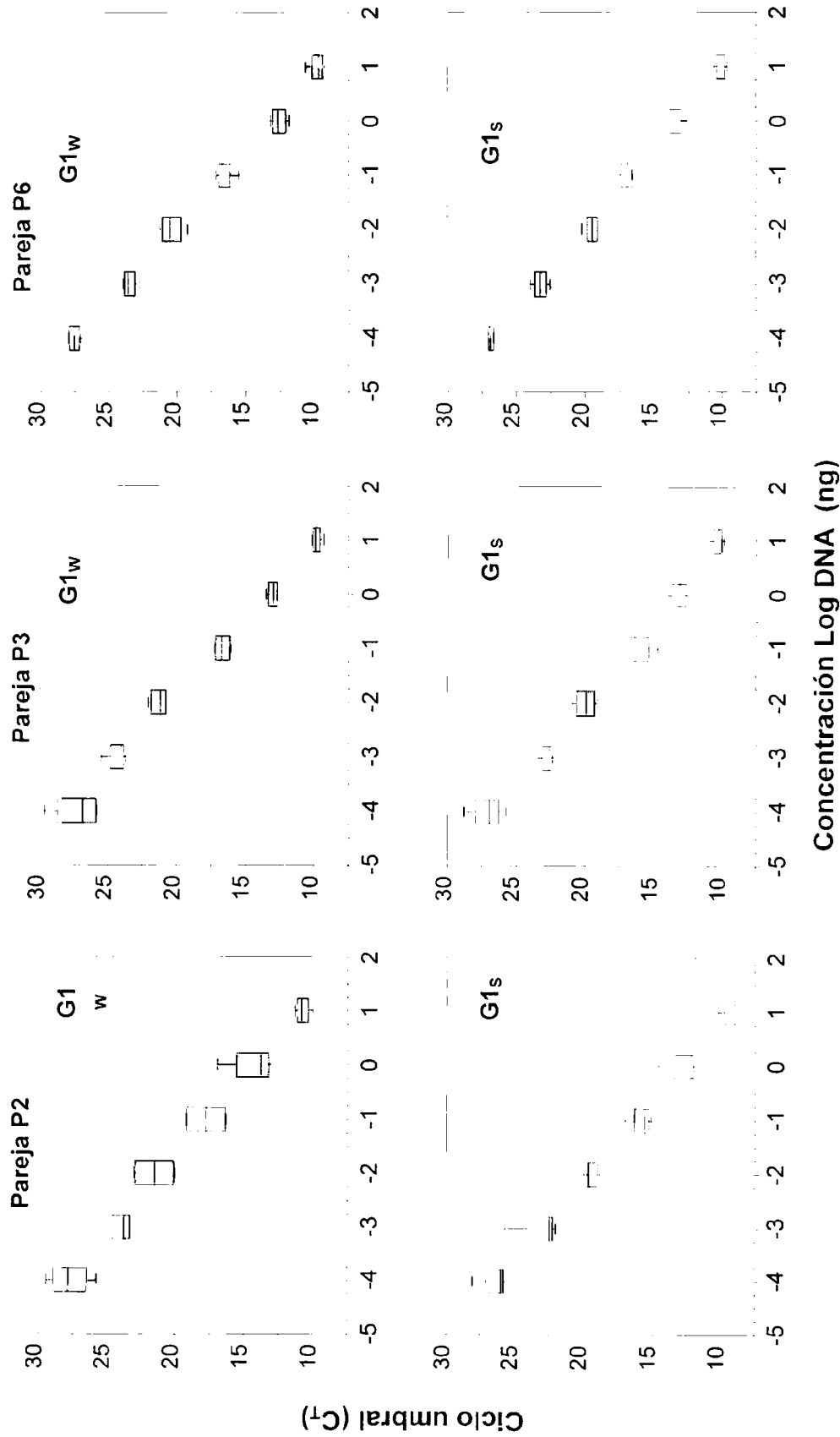


Figura 2

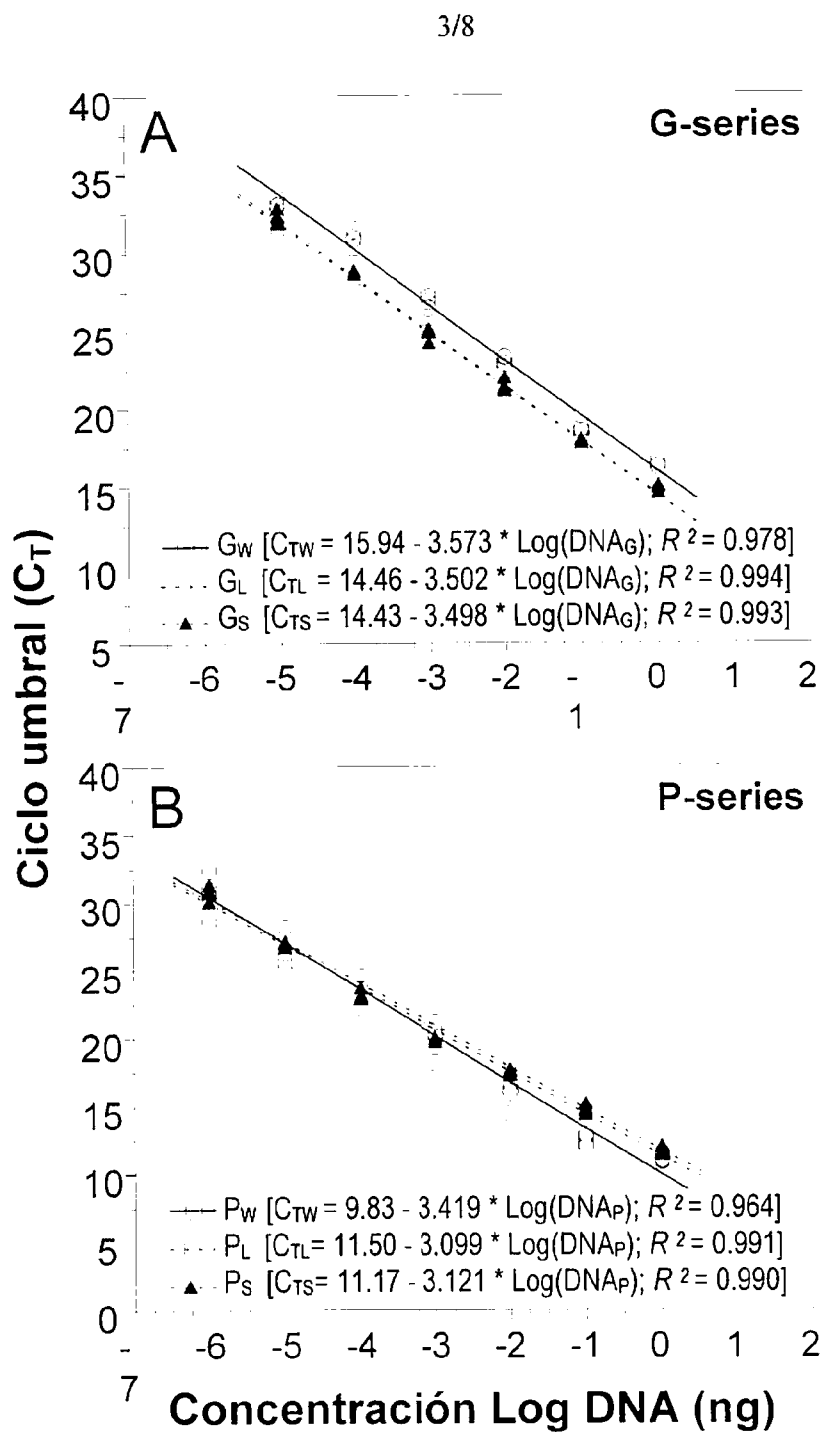


Figura 3

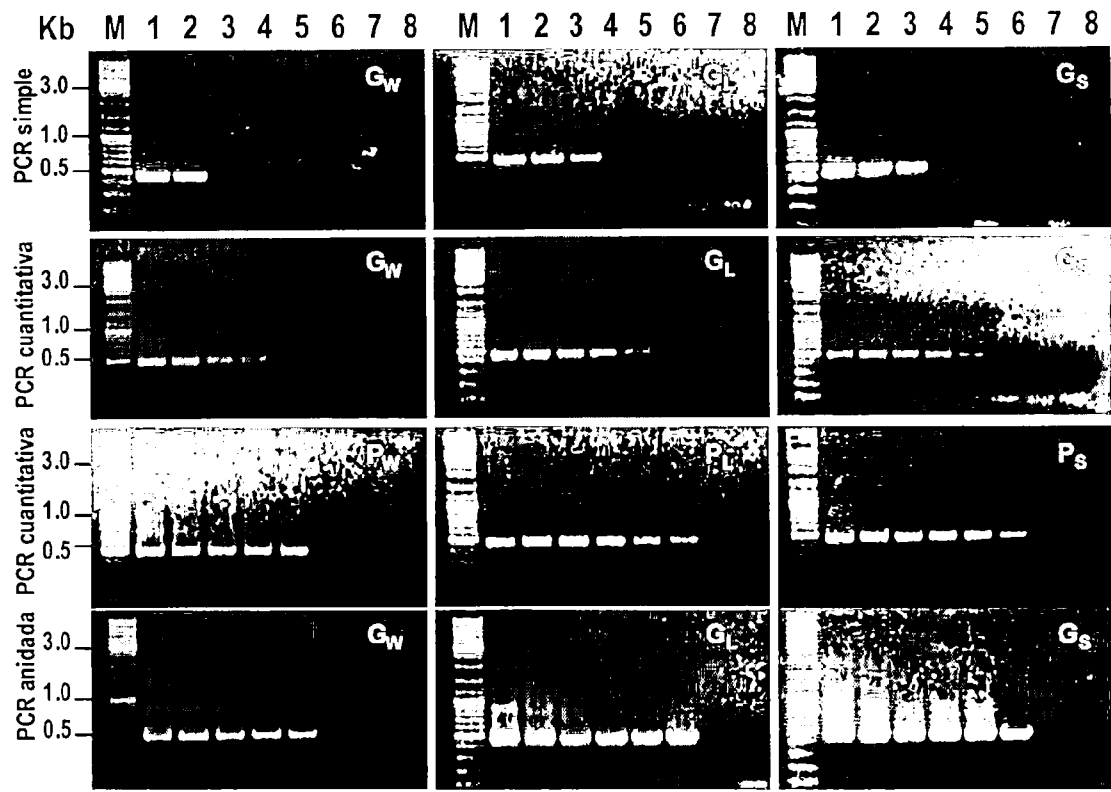


Figura 4

5/8

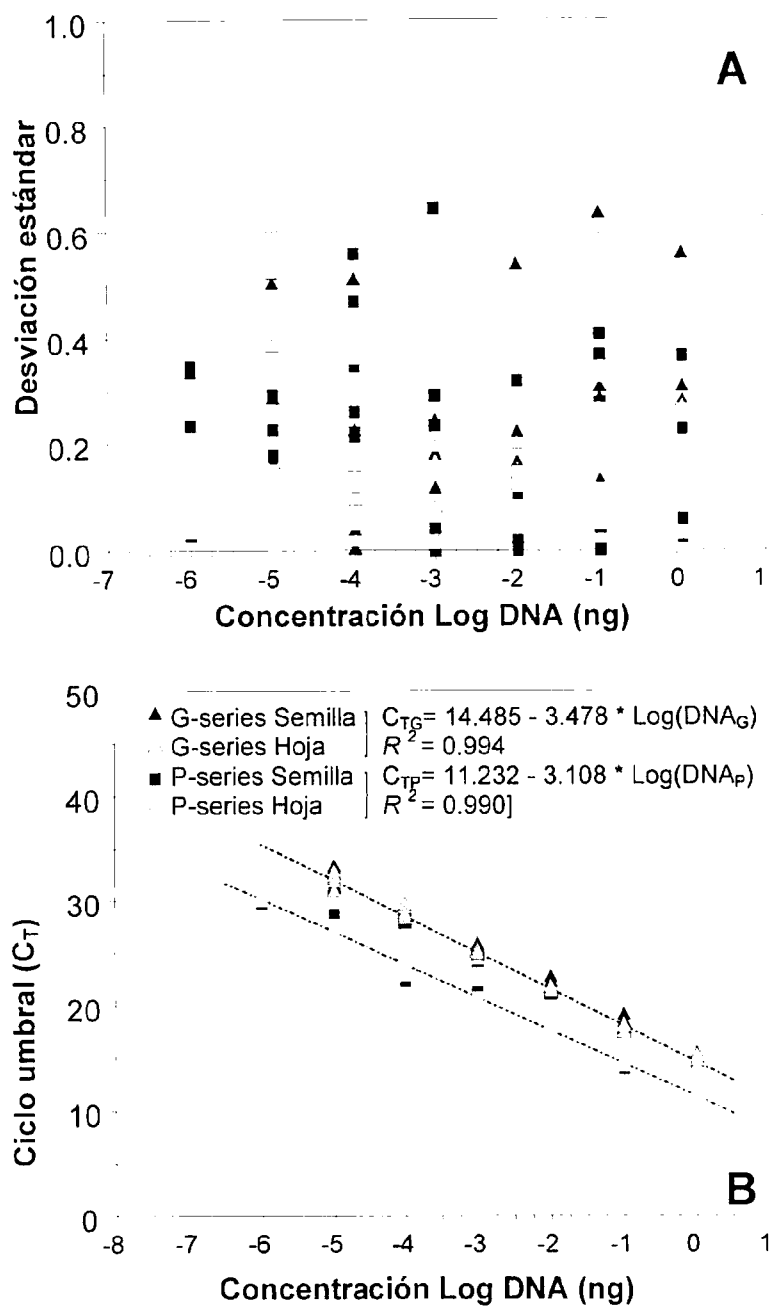


Figura 5

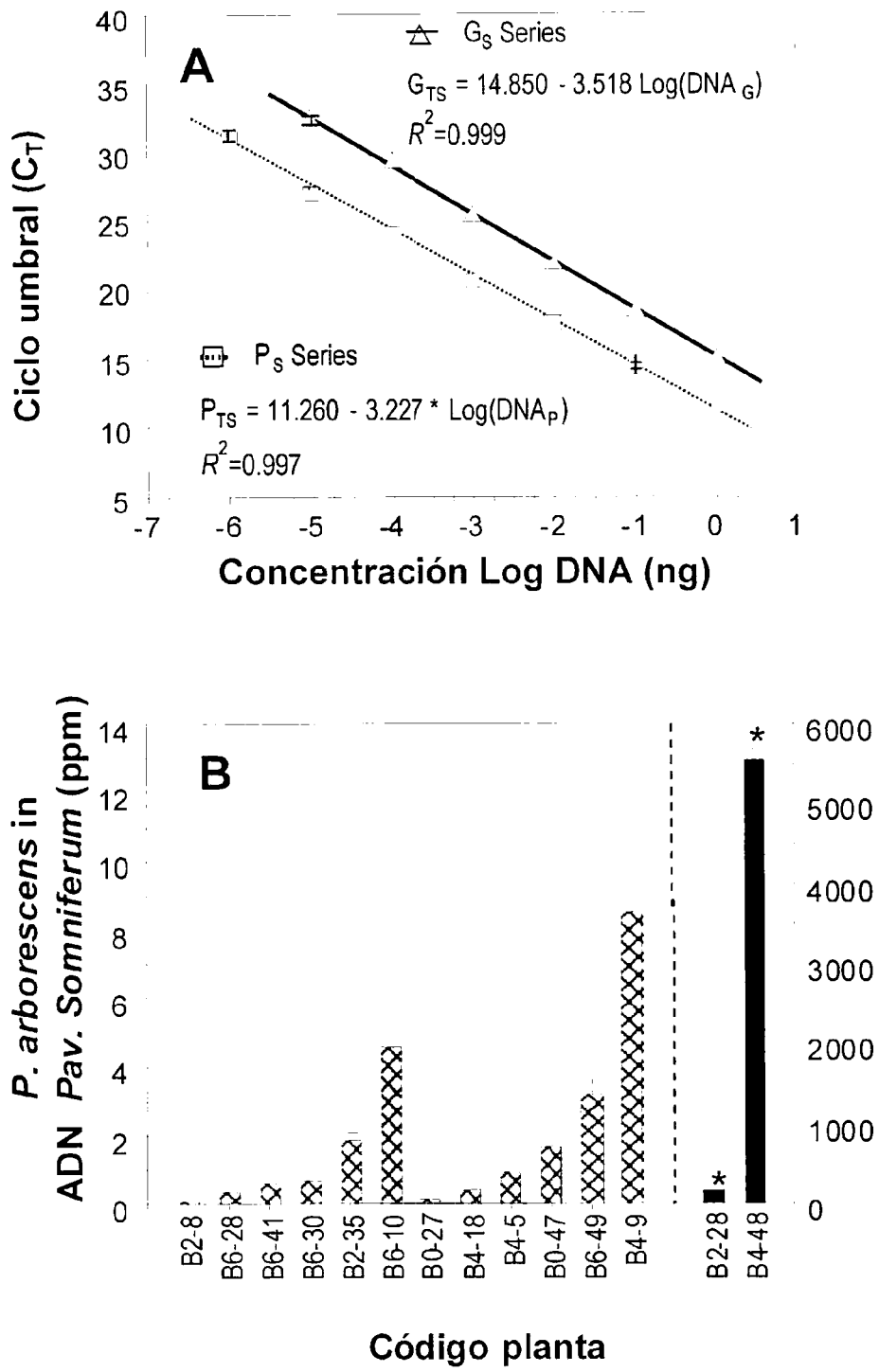


Figura 6

7/8

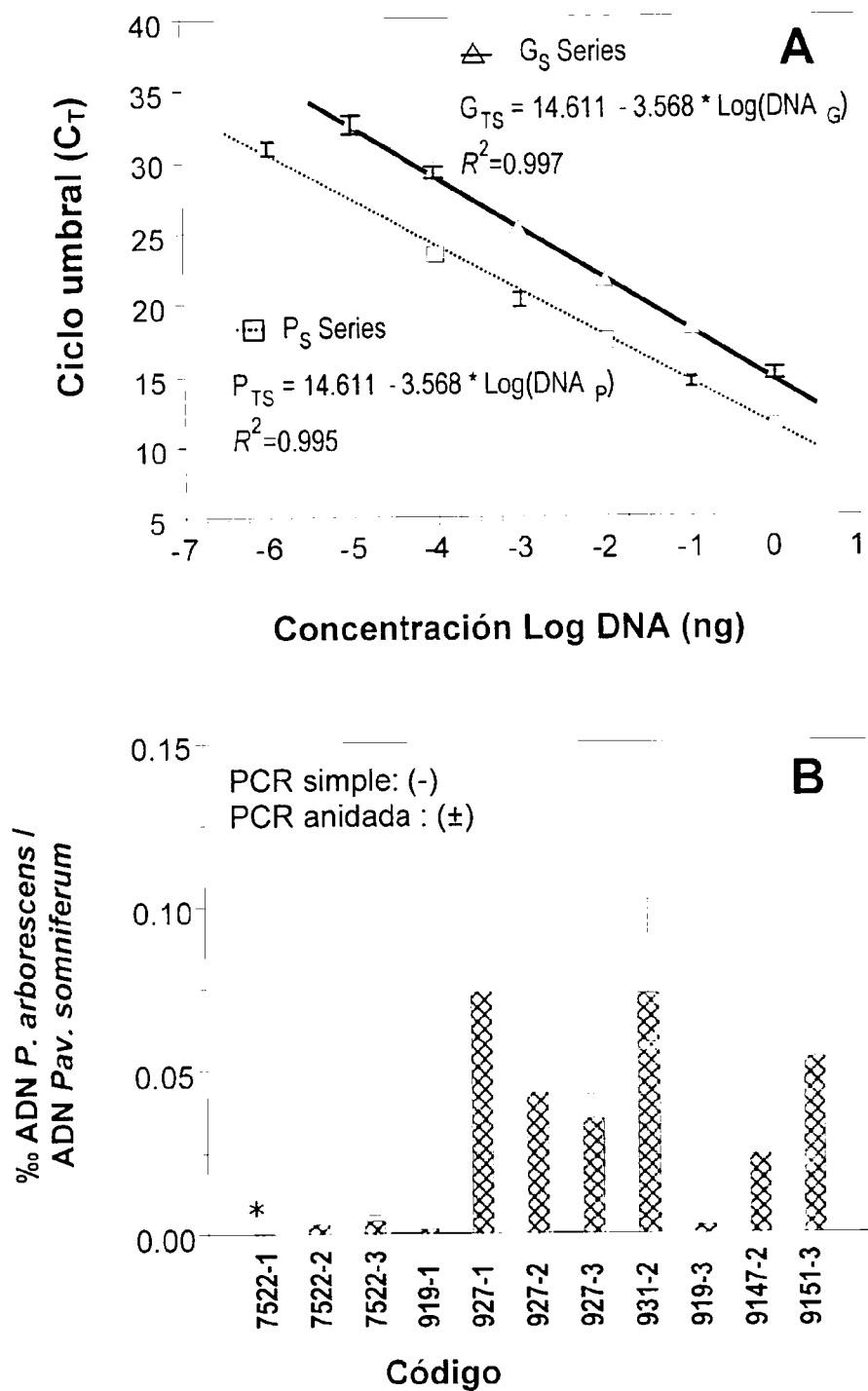


Figura 7

8/8

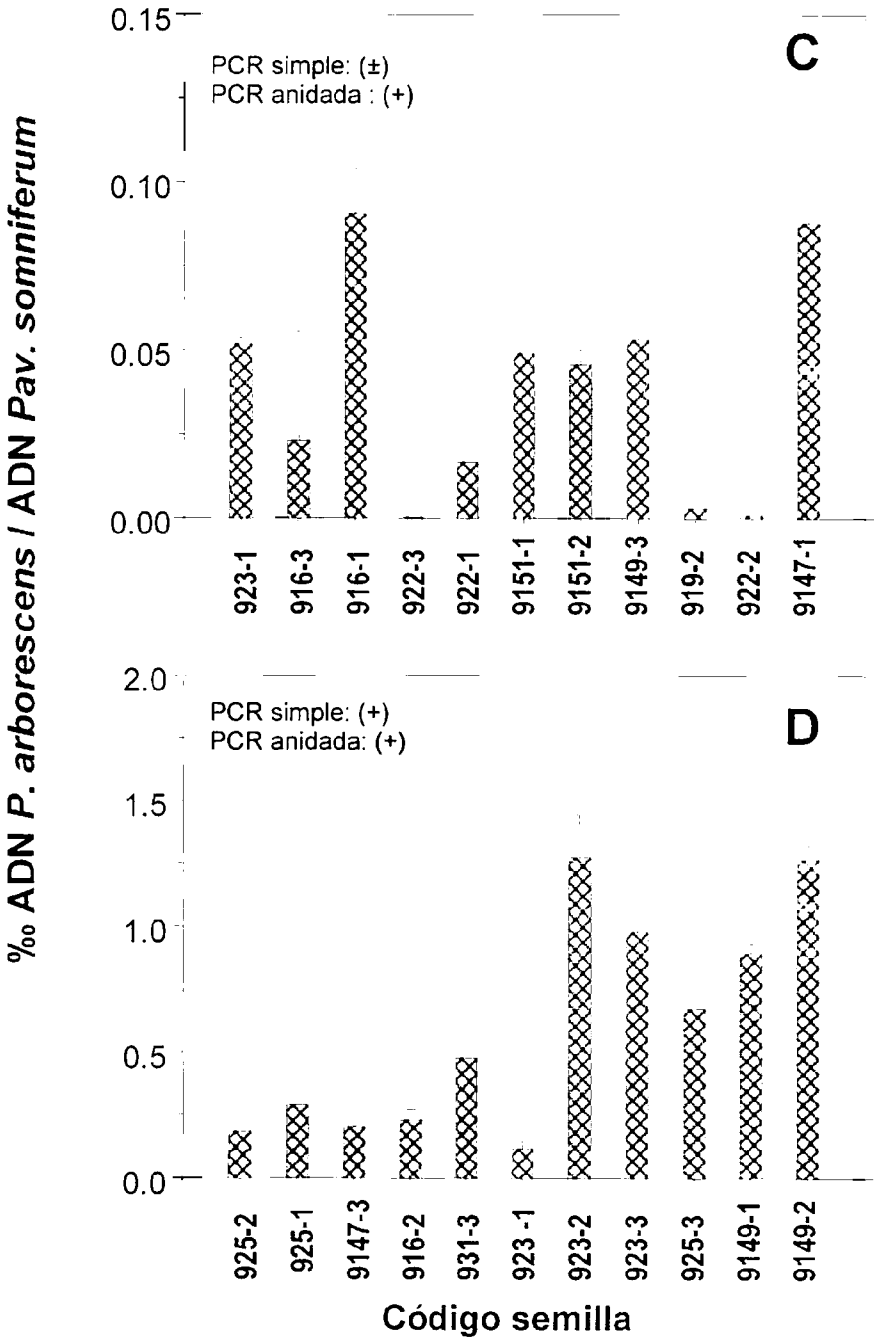


Figura 7 (cont.)