

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 022 861**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12Q 1/6874** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2021 PCT/EP2021/061366**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2021 WO21228578**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2021 E 21721940 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025 EP 4150108**

54 Título: **Detección temprana de agentes patógenos en las plantas**

30 Prioridad:

**13.05.2020 EP 20174320**  
**03.07.2020 EP 20183910**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.05.2025**

73 Titular/es:

**BAYER AKTIENGESELLSCHAFT (100.00%)**  
**Kaiser-Wilhelm-Allee 1**  
**51373 Leverkusen, DE**

72 Inventor/es:

**BUER, BENJAMIN;**  
**AL DILAIMI-WENDLER, ARWA;**  
**MEHL, ANDREAS y**  
**KLEEMANN, JOCHEN**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 3 022 861 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

Detección temprana de agentes patógenos en las plantas

5 La presente invención se refiere a la detección temprana de agentes patógenos en, sobre o dentro de las plantas o partes de la planta, así como a la identificación de signos de resistencia de estos agentes patógenos a agentes de control químico o biológico. Los objetos de la presente invención son un sistema, un método y un medio legible por ordenador para la detección temprana de la presencia de agentes patógenos en, sobre o dentro de las plantas o partes de la planta por medio del análisis de secuencias y la identificación de signos de resistencia.

10 Es muy importante la detección en una etapa temprana de una planta infectada por un agente patógeno. Cuanto antes se detecte una infección, antes se podrán tomar las medidas adecuadas para impedir un brote de la enfermedad y/o su propagación o evitar daños a las plantas.

15 En el documento WO2017/194276 se describe un método para detectar enfermedades de las plantas basado en el análisis de imágenes de una parte de la planta. Sin embargo, una planta puede estar infectada por una población de agentes patógenos sin que aparezcan síntomas visibles. Además, el estado de resistencia de la población de agentes patógenos no puede determinarse mediante este tipo de análisis de imágenes.

20 En el documento US20120088696A1 se describe una plataforma de PCR multiplex microelectroquímica que puede utilizarse para amplificar, analizar y cuantificar nucleótidos objetivo en tiempo real y, por ejemplo, para la detección rápida de enfermedades de las plantas. Sin embargo, la plataforma debe personalizarse en cada caso concreto para la detección de una enfermedad específica y, en comparación, su uso es complejo.

25 Sería ventajoso que no sólo se pudieran detectar los agentes patógenos en una fase temprana, sino también que se pudiera identificar la resistencia a un agente de control en la población de agentes patógenos en una etapa temprana.

30 El documento WO2019149626A1 se refiere a la identificación de marcadores de resistencia en el campo.

La presente invención es un complemento de la solución descrita en el documento WO2019149626A1. La presente invención combina la determinación de la resistencia con la detección temprana de agentes patógenos en las plantas. Las soluciones presentadas en esta descripción son eficaces, adaptables y pueden incorporar más información a la detección temprana de agentes patógenos y resistencias.

35 Un primer objeto de la presente invención es un método que comprende las etapas:

- Recogida de una muestra de una planta o de un medio en el que crece la planta,
- identificación de un patógeno en la muestra,
- identificación de signos de una resistencia del patógeno a un agente de control,

45 o en donde la identificación del patógeno y la identificación de los signos de resistencia se realiza secuenciando ácidos nucleicos individuales o péptidos individuales de la muestra, en donde las secuencias de nucleótidos o las secuencias de aminoácidos se determinan al secuenciar los ácidos nucleicos individuales o los péptidos individuales, en donde las secuencias de nucleótidos o las secuencias de aminoácidos se comparan con secuencias de referencia, en donde la secuenciación se realiza en dos fases, una primera fase y una segunda fase,

50 o en donde en la primera fase, durante la secuenciación de cada ácido nucleico o péptido, la secuencia determinada en cada caso se compara con al menos una secuencia de patógeno, y

55 ▪ en el caso de que la secuencia determinada no coincida con la al menos una secuencia de patógeno, se detiene la secuenciación posterior de este ácido nucleico o este péptido,

60 ▪ en el caso de que la secuencia determinada coincida con una secuencia de patógeno, se determina un patógeno que tiene la secuencia de patógeno y se determina al menos un marcador de resistencia basándose en el patógeno determinado, y se pasa a la segunda fase,

o en donde, en la segunda fase, las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra se comparan con el al menos un marcador de resistencia determinado y/o con una secuencia sin resistencia.

65 Otro objeto de la presente invención es un sistema que comprende

- una unidad de secuenciación,
- una unidad de control y cálculo y

5 • al menos una memoria de datos en la que se almacena al menos una secuencia de patógeno y al menos un marcador de resistencia para al menos un patógeno,

10 en donde la unidad de secuenciación está configurada para secuenciar ácidos nucleicos o péptidos en una muestra de una planta o de un medio en el que crece la planta, y de este modo determinar secuencias de nucleótidos o aminoácidos en la muestra,

en donde la unidad de secuenciación está configurada para transmitir las secuencias determinadas en cada caso a la unidad de control y cálculo durante la determinación de las secuencias,

15 en donde la unidad de control y cálculo está configurada para comparar en una primera fase cada secuencia transmitida de un ácido nucleico o un péptido con al menos una secuencia de patógeno, y

20 • en el caso de que una secuencia transmitida no coincida con la al menos una secuencia de patógeno, ordenar a la unidad de secuenciación que detenga la secuenciación posterior del ácido nucleico o péptido respectivo,

25 • en el caso de que una secuencia transmitida coincida con una secuencia de patógeno, determinar un patógeno que tiene la secuencia de patógeno y determinar al menos un marcador de resistencia basándose en el patógeno determinado, y pasar a una segunda fase,

en donde la unidad de control y cálculo está configurada para comparar secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con el al menos un marcador de resistencia determinado y/o una secuencia sin resistencia en la segunda fase.

30 Otro objeto de la presente invención es un medio (medio de almacenamiento) legible por ordenador que comprende instrucciones que, cuando son ejecutadas en un ordenador, hacen que el ordenador realice las siguientes etapas:

35 • para una pluralidad de ácidos nucleicos o péptidos: recepción de una sucesión creciente de nucleótidos o aminoácidos en el ácido nucleico o péptido respectivo desde una unidad de secuenciación;

• en una primera fase durante la recepción de la sucesión creciente: comprobar si la sucesión de nucleótidos o aminoácidos está contenida una o más veces en al menos una secuencia de patógeno;

40 • en el caso de que la sucesión no esté contenida en ninguna secuencia de patógeno: transmitir una señal a la unidad de secuenciación para detener la secuenciación posterior del ácido nucleico o péptido;

45 • en el caso de que la sucesión coincida con una secuencia de patógeno: determinar un patógeno que tiene la secuencia de patógeno y determinar al menos un marcador de referencia, e iniciar una segunda fase;

• en la segunda fase: comparar las sucesiones de nucleótidos o aminoácidos con el al menos un marcador de referencia y/o una secuencia sin resistencia.

50 Otro objeto de la presente invención es un programa informático que comprende instrucciones que, cuando el programa informático es ejecutado en un ordenador, hacen que el ordenador realice las siguientes etapas:

55 • para una pluralidad de ácidos nucleicos o péptidos: recepción de una sucesión creciente de nucleótidos o aminoácidos en el ácido nucleico o péptido respectivo desde una unidad de secuenciación;

• en una primera fase durante la recepción de la sucesión creciente: comprobar si la sucesión de nucleótidos o aminoácidos está contenida una o más veces en al menos una secuencia de patógeno;

60 • en el caso de que la sucesión no esté contenida en ninguna secuencia de patógeno: transmitir una señal a la unidad de secuenciación para detener la secuenciación posterior del ácido nucleico o péptido;

65 • en el caso de que la sucesión coincida con una secuencia de patógeno: determinar un patógeno que tiene la secuencia de patógeno y determinar al menos un marcador de referencia, e iniciar una segunda fase;

- en la segunda fase: comparar las sucesiones de nucleótidos o aminoácidos con el al menos un marcador de referencia y/o una secuencia sin resistencia.

5 Las realizaciones preferentes de la presente invención pueden encontrarse en las reivindicaciones de patente dependientes, en la presente descripción y en los dibujos.

10 La invención se explica con más detalle a continuación sin distinguir entre los objetos de la invención (método, sistema, medio legible por ordenador, programa informático). En realidad, las explicaciones que se dan a continuación se aplicarán de manera análoga a todos los objetos de la invención, independientemente del contexto (método, sistema, medio legible por ordenador, programa informático) en el que se realizan.

15 Si las etapas se enumeran en un orden en la presente descripción o en las reivindicaciones, esto no significa necesariamente que la invención se limite al orden mencionado. Más bien, es concebible que las etapas también puedan realizarse en un orden diferente o también en paralelo; a menos que una etapa se base en otra etapa, lo que hace imperativo que la etapa sucesiva se ejecute posteriormente (esto quedará claro en casos individuales). Por lo tanto, el orden mencionado representa formas de realización preferentes del método de acuerdo con la invención.

20 La presente invención proporciona medios que permiten a un usuario detectar en una fase temprana una infección de una planta con agentes patógenos y los signos de resistencia de los patógenos a un agente de control.

25 El término "agente patógeno" se refiere a microorganismos o patógenos subcelulares que causan procesos nocivos en otros organismos. Los agentes patógenos pueden ser, por ejemplo, algas, bacterias, parásitos, hongos, priones, protistas, virus o viroides. En esta descripción, el término "patógeno" se utiliza como sinónimo del término agente patógeno. Preferentemente, la presente invención se refiere a la detección temprana de hongos que dañan las plantas.

30 El término "agente de control" se refiere a un agente que puede utilizarse para controlar eficazmente los agentes patógenos y/o evitar su propagación. Algunos ejemplos de agentes de control son los fungicidas, los insecticidas y los herbicidas. Un agente de control suele comprender una o más sustancias activas. Las "sustancias activas" son sustancias químicas o biológicas que tienen un efecto específico o provocan una reacción específica en un agente patógeno.

35 El término "resistencia" se refiere a una propiedad de los agentes patógenos individuales de una especie que se caracteriza por que estos individuos pueden resistir el tratamiento con un agente de control utilizado comúnmente para controlar la especie y pueden completar su ciclo de desarrollo con normalidad o seguir propagándose.

40 Por "usuario" se entiende una persona que lleva a cabo la invención; en particular, el usuario es una persona que utiliza el sistema de acuerdo con la invención y/o utiliza un ordenador en el que está instalado el programa informático de acuerdo con la invención para llevar a cabo la invención.

45 Se puede distinguir entre dos tipos de resistencia: la resistencia específica del sitio de acción, también conocida como resistencia específica del sitio objetivo, y la resistencia metabólica, también conocida como resistencia no específica del sitio objetivo.

50 La resistencia específica del sitio de acción suele estar causada por una mutación en un único gen asociado al objetivo de un agente de control en el patógeno. La mutación puede, por ejemplo, causar una expresión más fuerte de la proteína objetivo o un cambio en el sitio al que se une la sustancia activa del agente de control. Existen pruebas biológicas moleculares para detectar este tipo de resistencia.

La resistencia sin un vínculo directo con el sitio de acción (resistencia no específica del sitio objetivo) se debe a todos los demás mecanismos, por ejemplo, una absorción más lenta del agente de control por parte del patógeno.

55 Con la presente invención, en particular la resistencia específica del sitio objetivo puede detectarse en una fase temprana.

60 Los agentes patógenos/patógenos en los que se centra la presente invención atacan principalmente a las plantas, preferentemente a las plantas de cultivo. El término "planta de cultivo" se refiere a una planta que se ha cultivado intencionadamente como cultivo mediante la intervención humana. Algunas partes de las plantas de cultivo pueden ser aptas para el consumo humano y/o animal.

65 En principio, es concebible que las enseñanzas de la presente invención puedan aplicarse también a los animales, en particular a los animales de producción. Otro objeto de la presente invención es, por tanto, la aplicación de las enseñanzas expuestas en esta descripción a los animales, en particular a los animales de producción.

En una primera etapa, se recoge al menos una muestra. El término "recogida" no debe entenderse de ningún modo como limitativo. Un ejemplo de sinónimo es el término "muestreo".

5 La muestra se toma de la planta o del medio en el que crece la planta. Además del suelo, el término "medio" también debe incluir cualquier otro sustrato que esté en contacto con la planta y que le proporcione soporte y/o nutrientes. En el caso de las plantas acuáticas, también puede tomarse una muestra del agua que rodea a la planta acuática.

10 Preferentemente, se recoge como muestra una parte de la planta, por ejemplo una hoja, una flor, un tallo, una raíz, polen, corteza y/o una parte de dichos componentes y/o varios de dichos componentes y/u otros componentes. También puede tomarse una muestra de las "exudaciones", como el néctar de las flores o la resina. Preferentemente, se toman diferentes tipos de tejido de la planta y se combinan para cubrir una amplia gama de agentes patógenos. Preferentemente, en el momento del muestreo, la planta se encuentra en una fase de desarrollo temprana.

15 La fase de desarrollo de una planta puede indicarse, por ejemplo, mediante el código BBCH. Las siglas BBCH significan oficialmente *Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie*. La escala BBCH ampliada para la codificación normalizada de los estados de desarrollo fenológico de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas es un proyecto conjunto del Centro Federal de Investigación Biológica para la Agricultura y la Silvicultura (BBA), la Oficina Federal de Variedades Vegetales (BSA), la Asociación de la Industria Agrícola (IVA) y el Instituto de Cultivos Vegetales y Ornamentales Großbeeren/Erfurt (véase, por ejemplo, <https://www.juliuskuehn.de/publikationsreihen-desjki/bbch-skala>).

20 Preferentemente, la planta se encuentra en el momento del muestreo en el macroestadio 1 (desarrollo de las hojas [brote principal]) o en el macroestadio 2 (formación de brotes laterales) o en el macroestadio 3 (crecimiento longitudinal o crecimiento en roseta del brote principal/desarrollo de brotes/encañado [brote principal]) o en el macroestadio 4 (desarrollo de las partes vegetativas de la planta o de órganos vegetativos de propagación/embuchamiento de espigas o panículas) o en el macroestadio 5 (emergencia del primordio floral) o en el macroestadio 6 (floración) de la escala BBCH. Se ha descubierto que los hongos y/o las esporas fúngicas ya pueden detectarse en, sobre o dentro de una planta en estas fases tempranas, sin que sea necesario que la planta muestre síntomas visibles de la enfermedad. La detección en un momento tan temprano permite tratar la planta a tiempo para prevenir o reducir el riesgo de brote de la enfermedad y/o la multiplicación o propagación de agentes patógenos y/o la transmisión de agentes patógenos a plantas vecinas.

25 El muestreo puede automatizarse. "Automatizado" significa que el muestreo lo realizan una o varias máquinas sin intervención humana. Dicha máquina o dispositivo para el muestreo automatizado también se denomina en esta descripción "unidad de muestreo".

30 El muestreo puede llevarse a cabo mediante un dispositivo móvil o mediante un dispositivo móvil que se desplaza o es desplazado, por ejemplo, en un campo de cultivo y/o a través del campo. Por ejemplo, es concebible el uso de una máquina agrícola (preferentemente no tripulada) y/o un vehículo aéreo (preferentemente no tripulado) (por ejemplo, un dron) y/o un robot. En un invernadero, el uso de un robot para el muestreo automatizado es ideal.

35 El muestreo también puede llevarse a cabo mediante uno o varios dispositivos fijos en un mismo lugar.

40 También es concebible que un usuario (ser humano) pueda realizar el muestreo por sí mismo.

45 La muestra se introduce en una unidad de secuenciación. La unidad de secuenciación está configurada para determinar las secuencias de ácidos nucleicos o péptidos contenidos en la muestra.

50 Los "ácidos nucleicos" son macromoléculas formadas por estructuras individuales, los nucleótidos, que contienen la información genética de los organismos y los agentes subcelulares (como los virus). Los ácidos nucleicos se presentan en la naturaleza de dos formas: ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). El ADN es el material genético de todos los organismos vivos, desde las bacterias unicelulares hasta los mamíferos pluricelulares. Algunos virus utilizan ARN en lugar de ADN como material genético. Preferentemente, se secuencian las cadenas de ADN de una muestra.

55 Un "péptido" es un compuesto orgánico que contiene enlaces peptídicos entre los aminoácidos. Las cadenas de péptidos largas también se conocen como proteínas. Las proteínas se encuentran en todas las células y sirven como "herramientas" moleculares, que cumplen diferentes funciones según su estructura particular, por ejemplo, permiten el movimiento celular, transportan metabolitos, bombean iones, catalizan reacciones químicas o reconocen sustancias señalizadoras. En esta descripción, los términos "péptido" y "proteína" se utilizan como sinónimos.

60 El término "secuenciación/secuenciar" se refiere a la determinación de la sucesión de nucleótidos en un ácido nucleico o a la determinación de la sucesión de aminoácidos en un péptido (proteína). La secuencia es, por tanto,

la sucesión de nucleótidos o la sucesión de aminoácidos. Los términos "secuencia" y "sucesión" se utilizan como sinónimos en esta descripción.

Es concebible que la muestra deba ser procesada antes de poder ser secuenciada. Durante este procesamiento, las células de la muestra pueden romperse, por ejemplo para liberar las moléculas de ADN, que posteriormente pueden extraerse y, opcionalmente, fragmentarse. Las acciones correspondientes para el procesamiento se describen en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, R. P. Schaudies (Ed.): *Biological Identification*, Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials: Número 59, Elsevier 2014, ISBN 978-0-85709-501-5; Jianping Xu: *Next-generation Sequencing*, Caister Academic Press 2014, ISBN 978-1-908230-33-1; Vijai Bhadauria: *Next-generation Sequencing and Bioinformatics for Plant Science*, Caister Academic Press 2017, ISBN 978-1-910190-65-4). Para el procesamiento de las muestras puede utilizarse una unidad de procesamiento de muestras, que puede ser un componente de la unidad de muestreo y/o de la unidad de secuenciación o una unidad independiente.

Durante el procesamiento de las muestras, se pueden amplificar regiones específicas de los ácidos nucleicos presentes; sin embargo, la amplificación no es absolutamente necesaria. La amplificación puede ser útil para una región característica de una especie o una región mediante la que se puede identificar una especie de forma clara y/o fiable. Un ejemplo de este tipo de regiones es la región ITS.

La región ITS (ITS: región espaciadora interna transcrita) es una secuencia de nucleótidos utilizada frecuentemente en análisis filogenéticos. La región ITS es una región intergénica, no codificante, con una secuencia muy variable, por lo que resulta especialmente adecuada para determinar las relaciones en los niveles taxonómicos inferiores de especies, géneros y familias. El análisis de la secuencia de esta región puede utilizarse, en particular, para la identificación de géneros y especies de hongos (véase, por ejemplo, T.M. Pryce et al.: *Rapid identification of fungi by sequencing the ITS 1 and ITS 2 regions using an automated capillary electrophoresis system*; *Medical Mycology*, octubre de 2003, 41, 369-381; R. H. Nilsson et al.: *A Comprehensive, Automatically Updated Fungal ITS Sequence Dataset for Reference-Based Chimera Control in Environmental Sequencing Efforts*, *Microbes Environ.*, junio de 2015; 30(2): 145-150; A.J. Buehler et al.: *Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products*, *Dairy Sci.* 2017; 100(11): 8814-8825; C. L. Schoch et al.: *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*, *PNAS*, 17 de abril de 2012, 109 (16) 6241-6246). Comparando la secuencia ITS determinada y la secuencia del gen ARNr 5,8S de una cepa fúngica que se desea identificar, se determinan las similitudes de secuencia que sirven de base para una asignación a un grupo taxonómico. La secuencia de nucleótidos de la región ITS es de aproximadamente 500-600 pares de bases. Además de las regiones altamente conservadas en las que la secuencia es idéntica para todos los hongos, también existen regiones variables. Estas regiones variables pueden ser firmas características de una especie, género o grupo de hongos. El análisis de estas secuencias parciales permite la clasificación taxonómica de las cepas fúngicas.

Dado que la región ITS aparece varias veces como una familia de genes con varios cientos a miles de copias repetidas en tándem, está mucho más presente estequiométricamente en comparación con un solo gen nuclear y, por tanto, es fácilmente accesible para los análisis filogenéticos moleculares. Otra ventaja de utilizar la región ITS para los análisis filogenéticos moleculares es su ubicación. La región ITS se encuentra en el grupo de genes de ARNr. Consiste en dos segmentos de secuencia, el espaciador interno transcrito 1 (ITS-1) y el espaciador interno transcrito 2 (ITS-2), que están situados entre los genes de ADNr altamente conservados 26S, 5,8S y 18S. Esta ubicación permite utilizar como secuencias de cebadores segmentos de secuencia de ADNr de los genes de ADNr altamente conservados. Por lo tanto, la amplificación de las secuencias ITS-1 e ITS-2 mediante PCR es posible de manera sencilla.

Los ácidos nucleicos o péptidos presentes en la muestra son secuenciados por la unidad de secuenciación. La secuenciación se realiza preferentemente mediante métodos basados en la nanotecnología (véase, por ejemplo M. Loose et al.: *Real-time selective sequencing using nanopore technology*, *Nature Methods* 2016, volumen 13, número 9, 751-758). En la secuenciación por nanoporos, por ejemplo, los ácidos nucleicos son transportados individualmente por una enzima (helicasa) a través de un poro de tamaño nanométrico situado en una membrana polimérica no conductora. Si se aplica un voltaje a través de esta membrana, se produce un flujo de iones a través del poro, cuyo tamaño depende de las bases del poro. De esta forma, midiendo la corriente iónica durante la translocación del ADN/ARN a través del poro, se puede medir tanto la secuencia de bases como cualquier modificación de las mismas.

La secuenciación de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en al menos dos fases, una primera y una segunda. La primera fase sirve para aclarar si existe algún patógeno en la muestra. La segunda fase sólo tiene lugar si se identifica un patógeno en la primera fase. La segunda fase se utiliza para identificar signos de resistencia del patógeno identificado a uno o más agentes de control. En ambas fases, se secuencian los ácidos nucleicos o los péptidos y se determinan la sucesión de nucleótidos y la sucesión de aminoácidos. En ambas fases, las secuencias determinadas se comparan con secuencias de referencia durante la determinación. En la primera fase, las secuencias determinadas se comparan con al menos una secuencia de patógeno. Preferentemente, se realiza una comparación con una serie de secuencias de patógeno. Si existe una coincidencia entre una sucesión de nucleótidos o una sucesión de aminoácidos determinada y una secuencia de patógeno, se puede suponer que el

patógeno está contenido en la muestra. De este modo, se puede identificar un patógeno contenido en la muestra. En la segunda fase, las secuencias determinadas se comparan con al menos un marcador de resistencia que se haya observado en el pasado en el patógeno determinado y/o con una secuencia sin resistencia. Esta comparación se utiliza para identificar signos de resistencia del patógeno detectado a uno o más agentes de control. Una secuencia sin resistencia es una sucesión de nucleótidos o una sucesión de aminoácidos de un patógeno que no muestra signos de resistencia del patógeno a un agente de control. La secuencia de patógeno, el marcador de resistencia y la secuencia sin resistencia son secuencias de referencia que pueden tomarse, por ejemplo, de una o varias bases de datos.

En primer lugar, se analizará con más detalle la primera fase.

Normalmente, una gran proporción de los ácidos nucleicos o péptidos presentes en una muestra son atribuibles a la planta, especialmente si la muestra es un componente de una planta. Sin embargo, determinar la secuencia de un ácido nucleico vegetal o de una proteína vegetal tiene un interés secundario. De acuerdo con la invención, la secuenciación de un ácido nucleico o de un péptido se cancela en la primera fase de secuenciación en cuanto se establece que el ácido nucleico o el péptido no proceden de un agente patógeno (sino, por ejemplo, de la planta).

Para ello, los resultados de la secuenciación se comparan con una o varias secuencias de patógeno durante la secuenciación. Mientras se comprueba la secuencia de nucleótidos en un ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos en un péptido, se comprueba si la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos está contenida en una o más secuencias de patógeno. Esto se puede ilustrar con un ejemplo. Primero se determina el primer nucleótido de un ácido nucleico, luego el segundo y así sucesivamente. La sucesión de nucleótidos aumenta con cada nuevo nucleótido detectado. Si se ha determinado otro nucleótido de la sucesión, se comprueba si la secuencia (creciente) está contenida en una o más secuencias de patógeno. Por ejemplo, es muy probable que una sucesión de cuatro nucleótidos esté contenida en una o más posiciones de una secuencia de patógeno. Sin embargo, con una sucesión de veinte nucleótidos, es posible que esta sucesión ya no se produzca en ninguna posición de la secuencia de patógeno. En cuanto se encuentre que una secuencia de nucleótidos determinada durante la secuenciación no está contenida en ninguna posición de una o varias secuencias de patógeno, la secuenciación puede terminarse; cualquier determinación de un nucleótido más en la sucesión de nucleótidos será irrelevante; ya está claro que el ácido nucleico que se está secuenciando actualmente no puede ser un ácido nucleico de un patógeno. Esto también se aplica de forma análoga a la determinación de la sucesión de aminoácidos en un péptido de la muestra.

La al menos una secuencia de patógeno utilizada para el alineamiento en la primera fase de secuenciación es una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos de un patógeno definido que es específica del patógeno (o de un grupo definido de patógenos, por ejemplo, patógenos de una especie, género, subfamilia, familia, suborden, orden o clase). Basándose en dicha secuencia de patógeno específica, se puede identificar un patógeno concreto (o un grupo de patógenos). Dicha secuencia de patógeno puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que comprenda toda o parte de la región ITS. En cualquier caso, la secuencia de patógeno debe ser una secuencia que difiera de las secuencias de la planta objeto de la investigación.

En una realización preferida, una o más secuencias de patógenos se seleccionan (automáticamente) basándose en información sobre la planta, el momento del muestreo, la ubicación del muestreo, las condiciones ambientales (temperatura, presión atmosférica, humedad, precipitaciones, etc.), el momento del muestreo y/o durante un intervalo de tiempo definido anterior al momento del muestreo (por ejemplo, datos meteorológicos y/o climáticos) y/o los antecedentes (por ejemplo, patógenos y/o enfermedades observados en el pasado). Por ejemplo, algunas enfermedades sólo se dan en determinadas plantas. Cuando se toma una muestra de una planta específica, se pueden seleccionar secuencias de patógeno de aquellos patógenos que infectan esta planta y pueden causar enfermedades. Además, los agentes patógenos sólo suelen aparecer en determinadas regiones y en determinadas condiciones ambientales. El lugar de muestreo proporciona información sobre la región y los agentes patógenos que suelen aparecer en ella. Las condiciones ambientales en el momento del muestreo y/o en un intervalo de tiempo definido (por ejemplo, cuatro semanas o tres semanas o dos semanas o una semana o un número de días) antes del momento del muestreo proporcionan información sobre qué agentes patógenos deben tenerse en cuenta en absoluto o qué agentes patógenos pueden excluirse. Dichos agentes patógenos, que ya se han observado en el pasado en el lugar de muestreo o en los alrededores (ya sea directa o indirectamente basándose en, por ejemplo, los síntomas de la enfermedad), pueden (si las condiciones ambientales y la planta considerada lo permiten) aparecer también en la actualidad, razón por la cual puede (y debe) seleccionarse una secuencia de patógeno específica de dicho patógeno porque este (el patógeno) ya ha aparecido en el pasado.

Una realización preferida de la presente invención comprende las siguientes etapas:

(1) Determinación de una planta.

(2) Identificación de al menos un patógeno que pueda infectar a la planta (que haya infectado a dicha planta en el pasado).

(3) Determinación de al menos una secuencia de patógeno para el al menos un patógeno determinado.

(4) Recogida de una muestra de la planta o de un medio en el que crece la planta.

5 (5) Identificación un agente patógeno en la muestra.

(6) Determinación de al menos un marcador de resistencia para el patógeno identificado.

10 (7) Identificación de signos de resistencia del patógeno identificado a un agente de control.

Otra realización preferida de la presente invención comprende las siguientes etapas:

(1) Determinación de una planta.

15 (2) Determinación de las condiciones ambientales a las que está y/o ha estado expuesta la planta.

(3) Identificación de al menos un patógeno que pueda infectar a la planta (que haya infectado a dicha planta en el pasado).

20 (4) Determinación de al menos una secuencia de patógeno para el al menos un patógeno determinado.

(5) Recogida de una muestra de la planta o de un medio en el que crece la planta.

25 (6) Identificación un agente patógeno en la muestra.

(7) Determinación de al menos un marcador de resistencia para el patógeno identificado.

(8) Identificación de signos de resistencia del patógeno identificado a un agente de control.

30 La determinación de la planta y/o la determinación de las condiciones ambientales puede realizarse, por ejemplo, mediante la introducción por parte de un usuario de la información pertinente en el sistema de acuerdo con la invención. La planta puede especificarse, por ejemplo, cuando el usuario introduce el nombre de la planta o el nombre de la variedad de la planta o un código para la planta/variedad de la planta (por ejemplo, según el Código Internacional de Nomenclatura de Plantas Cultivadas, abreviado como ICNCP) en el sistema de acuerdo con la invención o al seleccionar la información correspondiente sobre la planta de una lista o un menú o al seleccionar una planta basándose en una ilustración pictórica de la planta (por ejemplo, una foto o un gráfico), por ejemplo, en un monitor del sistema de acuerdo con la invención.

40 También es concebible que un usuario especifique una planta que se cultiva en un campo y, si es necesario, especifique también las coordenadas geográficas del campo. El sistema de acuerdo con la invención puede configurarse para determinar los patógenos que pueden aparecer en la especie vegetal basándose en la planta especificada y, opcionalmente, las coordenadas geográficas en una base de datos. Las coordenadas geográficas pueden utilizarse, por ejemplo, para determinar datos meteorológicos actuales y/o datos meteorológicos del pasado. Es concebible que para los patógenos que pueden aparecer en la planta, se seleccionen modelos que se basen en los datos meteorológicos para calcular una probabilidad de que estos patógenos aparezcan en la planta especificada en el momento actual. Es concebible que sólo se consideren con más detalle los patógenos para los que la probabilidad de que aparezcan en la planta especificada en el momento actual esté por encima de un valor umbral (probabilidad mínima). El valor umbral puede determinarse empíricamente o ser fijado arbitrariamente por un usuario.

50 Una realización preferida de la presente invención comprende las siguientes etapas:

(1) Determinación de una planta.

55 (2) Identificación de al menos un patógeno que pueda infectar a la planta (que haya infectado a dicha planta en el pasado).

(3) Determinación de las condiciones ambientales a las que está o ha estado expuesta la planta.

60 (4) Cálculo de una probabilidad de aparición de al menos un patógeno en la planta en el momento actual.

(5) Comparación de la probabilidad con un valor umbral predefinido.

65 (6) Determinación de las secuencias de patógeno de los patógenos identificados cuya probabilidad sea superior al valor umbral.

(7) Recogida de una muestra de la planta o de un medio en el que crece la planta.

(8) Identificación un agente patógeno en la muestra.

5 (9) Determinación de al menos un marcador de resistencia para el patógeno identificado.

10. (10) Identificación de signos de resistencia del patógeno identificado a un agente de control.

10 Preferentemente, una o más secuencias de patógeno están disponibles como índice FM. Un índice FM es un índice de subcadenas de texto completo comprimido basado en la transformación Burrows-Wheeler y fue desarrollado por P. Ferragina y G. Manzini (véase, por ejemplo: P. Ferragina y G. Manzini: *Opportunistic Data Structures with Applications*, Actas del 41.º Simposio Anual sobre Fundamentos de la Informática - *Proceedings of the 41st Annual Symposium on Foundations of Computer Science - 2000*; 390-398). El nombre índice FM significa Índice de texto completo en minutos (*Full-text index in Minute space*). El índice FM es una estructura de datos oportunista que permite tanto la comprensión del texto de entrada como consultas rápidas de subcadenas. Un índice FM puede utilizarse para determinar eficazmente el número de apariciones de un patrón en el texto de entrada comprimido y localizar la posición de cada aparición. El tiempo de consulta y el espacio de memoria necesario son sublinealmente complejos en relación con el tamaño de los datos de entrada.

20 La comparación de la sucesión de nucleótidos o la sucesión de aminoácidos que se acaba de determinar con una o más secuencias de patógeno puede llevarse a cabo mediante una unidad de control y cálculo. Dicha unidad de control y cálculo puede ser uno o varios ordenadores. La unidad de control y cálculo puede ser un componente de la unidad de secuenciación o una unidad independiente. La unidad de control y cálculo tiene acceso a una o varias memorias de datos. Al menos una secuencia de patógeno se almacena en la al menos una memoria de datos. La unidad de control y cálculo carga la al menos una secuencia de patógeno en una memoria de trabajo, recibe la sucesión de nucleótidos durante su determinación (nucleótido por nucleótido o en bloques de varios nucleótidos) y comprueba si la sucesión de nucleótidos (creciente) está presente una o varias veces en la secuencia de patógeno.

30 La tecnología de utilización de una sucesión de nucleótidos (creciente) en una secuencia durante su determinación para una comparación se describe en el estado de la técnica (véase por ejemplo S. Kovaka et al.: *Targeted nanopore sequencing by real-time mapping of raw electrical signal with UNCALLED*, <https://doi.org/10.1101/2020.02.03.931923>).

35 Tan pronto como se hace evidente que la sucesión determinada de nucleótidos o aminoácidos no aparece en ningún punto de la secuencia de patógeno, se detiene la secuenciación de la molécula respectiva y se detiene la secuenciación posterior de la molécula. La tecnología para suspender la determinación de una sucesión de nucleótidos se describe en el estado de la técnica (véase, por ejemplo: A. Payne et al.: *Nanopore adaptive sequencing for mixed samples, whole exome capture and targeted panels*, <https://doi.org/10.1101/2020.02.03.926956>). En el caso de la tecnología de nanoporos, por ejemplo, un ácido nucleico que ha sido canalizado a través de un poro puede ser transportado fuera del poro con la ayuda de un pulso de voltaje, con lo cual se detiene la secuenciación posterior.

45 Si no se secuencia ningún ácido nucleico o péptido con una secuencia de patógeno en la muestra en un intervalo de tiempo predefinido, se puede considerar que no hay ningún patógeno en la muestra. El intervalo de tiempo predefinido puede determinarse empíricamente. Se puede emitir un aviso indicando que no se ha encontrado ningún patógeno en la muestra.

50 En cuanto la secuencia de un ácido nucleico o de un péptido de la muestra coincide con una secuencia de patógeno específica, se puede considerar que el patógeno correspondiente está presente en la muestra. Por lo tanto, la información de la secuencia de patógeno señala automáticamente al patógeno respectivo. Para el patógeno determinado de esta manera, se utiliza una base de datos para comprobar si existe resistencia conocida a uno o más agentes de control. "Conocida" significa que se ha observado una resistencia correspondiente en una población del patógeno en el pasado. Si se ha observado al menos una resistencia, se determina al menos un marcador de resistencia.

Un "marcador de resistencia" es información genética que proporciona información sobre si un organismo nocivo podría desarrollar, está desarrollando o ha desarrollado resistencia a un agente de control.

60 Para un gran número de agentes patógenos se sabe qué secuencias indican que los patógenos desarrollan o muestran resistencia a un agente de control (véase, por ejemplo: S. Omrane et al.: *Plasticity of the MFS1 Promoter Leads to Multidrug Resistance in the Wheat Pathogen Zymoseptoria tritici*, <https://doi.org/10.1128/mSphere.00393-17>; Y. Choi et al.: *Identification of Genes Related to Fungicide Resistance in Fusarium fujikuroi*, *Mycobiology*. 2017, 45(2): 101-104; K. J. Brent: *Fungicide Resistance in crop pathogens: How can it be managed?* ISBN 90-72398-07-6; K. G. Zulak et al.: *Improved Detection and Monitoring of Fungicide Resistance in Blumeria graminis f. sp. hordei With High-Throughput Genotype Quantification by Digital PCR*, *Front Microbiol*. 2018, 9: 706; M. de miccolis et al.:

Genetics of Fungicide Resistance, DOI: 10.1007/978-4-431-55642-8\_2; H. B. Deising et al.: Mechanisms and significance of fungicide resistance, Braz. J. Microbiol. 2008, Vol.39 No.2; L. Kanetis et al.: Fungicide resistance profile and genetic structure of Botrytis cinerea from greenhouse crops in Cyprus, Eur. J. Plant. Pathol. 2017, 147, 527-540; J. L. Beckerman: Detection of Fungicide Resistance, DOI: 10.5772/55981; L. Yang et al.: Cross-resistance of the pathogenic fungus Alternaria alternata to fungicides with different modes of action, BMC Microbiol 2019, 19, 205).

Un "marcador de resistencia" es, por tanto, una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos que se encuentra en ácidos nucleicos o péptidos de poblaciones resistentes y que es responsable de la resistencia o la favorece. Por ejemplo, puede tratarse de la secuencia objetivo en un patógeno resistente que presenta una mutación en comparación con la misma especie no resistente. El "objetivo" define el sitio de acción del agente de control sobre el agente patógeno. Un cambio genético en la secuencia objetivo puede hacer que el agente de control deje de ser eficaz o sólo tenga un efecto reducido.

Si no se conoce ninguna resistencia para el patógeno identificado, se puede emitir un aviso indicando que se ha identificado un patógeno en la muestra, de qué patógeno se trata y que no se conoce ninguna resistencia para el patógeno.

Tan pronto como se haya identificado un patógeno en la muestra y se haya determinado al menos un marcador de resistencia para el patógeno, se inicia la segunda fase de secuenciación.

En la segunda fase, se continúa con la secuenciación de los ácidos nucleicos o péptidos presentes en la muestra; sin embargo, en la segunda fase el objetivo es identificar signos de resistencia del patógeno identificado a uno o más agentes de control. Para ello, las secuencias de nucleótidos o aminoácidos determinadas durante la secuenciación se comparan con el al menos un marcador de resistencia y/o con una secuencia sin resistencia.

Si en la secuenciación no se encuentran secuencias de nucleótidos o aminoácidos que coincidan con la secuencia de al menos un marcador de resistencia, se puede asumir que el patógeno identificado en la muestra no tiene resistencia conocida. Se puede emitir un aviso indicando que se ha encontrado un patógeno, de qué patógeno se trata y que no se han encontrado signos de resistencia conocida a un agente de control. Sin embargo, si se producen desviaciones de la secuencia sin resistencia, es posible que exista una resistencia (aún) desconocida y/o que el patógeno esté desarrollando una resistencia (aún desconocida). En este caso, se puede emitir un aviso indicando que se ha encontrado un patógeno, de qué patógeno se trata, y que no se han encontrado signos de resistencia conocida a un agente de control, pero que hay desviaciones en la sucesión de nucleótidos o aminoácidos respecto a la secuencia sin resistencia que pueden/deben considerarse más adelante.

Si la secuenciación revela sucesiones de nucleótidos o aminoácidos que coinciden con la secuencia de un marcador de resistencia, esto es un signo de la presencia de resistencia (conocida). Se puede emitir un aviso indicando que se ha encontrado un patógeno en la muestra, que el patógeno muestra signos de resistencia y se puede nombrar la resistencia, por ejemplo, basándose en el marcador de resistencia coincidente.

En una realización preferida, la etapa de "identificación de signos de resistencia del patógeno identificado a un agente de control" comprende las siguientes subetapas:

(1) Comparación de las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con el al menos un marcador de resistencia determinado y/o una secuencia sin resistencia,

(2) en el caso de que el marcador de resistencia no aparezca en ninguna de las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra y las secuencias de la muestra coincidan con la secuencia sin resistencia: emisión de un aviso de que no se ha encontrado ningún signo de resistencia para el patógeno identificado,

(3) en el caso de que el marcador de resistencia no aparezca en ninguna de las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra y las secuencias de la muestra no coincidan con la secuencia sin resistencia: emisión de un aviso indicando que no se han encontrado signos de resistencia conocida para el patógeno identificado, pero que se han encontrado desviaciones de la secuencia sin resistencia,

(4) en el caso de que el marcador de resistencia aparezca en una o más de las secuencias: emisión de un aviso indicando que se ha encontrado un signo de resistencia para el patógeno identificado y emisión de un aviso de la resistencia.

Es concebible que la secuencia de un ácido nucleico o un péptido de un patógeno resistente difiera de la secuencia correspondiente de un patógeno no resistente en sólo un nucleótido o pocos nucleótidos o en sólo un aminoácido o pocos aminoácidos. Por otra parte, siempre pueden producirse errores al secuenciar ácidos nucleicos o péptidos individuales. Por lo tanto, si se identifica un ácido nucleico o un péptido que tiene una secuencia de acuerdo con un marcador de resistencia, existe la posibilidad de que se trate de un error. Por lo tanto, es concebible que la

presencia de un signo de resistencia sólo se considere cuando se haya encontrado un número mínimo de ácidos nucleicos o aminoácidos que tengan una secuencia de acuerdo con un marcador de resistencia.

5 En una realización preferida, la etapa de "identificación de signos de resistencia del patógeno identificado a un agente de control" comprende las siguientes subetapas:

(1) Comparación de las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con el al menos un marcador de resistencia determinado,

10 (2) en el caso de que el marcador de resistencia no aparezca en ninguna de las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra o aparezca en un número de ácidos nucleicos inferior a un número mínimo predefinido: emisión de un aviso de que no se ha encontrado ningún signo de resistencia para el patógeno identificado,

15 (3) en el caso de que el marcador de resistencia aparezca en un número mínimo de secuencias o en un número superior al número mínimo: emisión de un aviso indicando que se ha encontrado un signo de resistencia para el patógeno identificado y emisión de un aviso de la resistencia.

20 En una realización preferida de la presente invención, las secuencias de ácidos nucleicos o péptidos de una muestra no se comparan (solamente) con marcadores de resistencia en la segunda fase de secuenciación, sino también con la secuencia correspondiente de un patógeno no resistente de la misma especie. En esta descripción, esta secuencia también se denomina secuencia sin resistencia. La secuencia sin resistencia es también una secuencia de referencia.

25 Es concebible que en la muestra se encuentren ácidos nucleicos o péptidos que procedan de un patógeno, pero su secuencia no coincida ni con el marcador de resistencia ni con la secuencia sin resistencia. Es posible que se trate de una nueva mutación que podría dar lugar a una resistencia aún desconocida. Mediante el alineamiento de las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con la secuencia sin resistencia, se pueden identificar en una fase temprana nuevas resistencias, posiblemente en desarrollo.

30 Una realización preferida de la presente invención comprende las siguientes etapas:

• Recogida de una muestra de una planta o de un medio en el que crece la planta.

35 • Identificación de un patógeno en la muestra.

• Determinación de al menos un marcador de resistencia para el patógeno identificado y determinación de una secuencia sin resistencia para el patógeno identificado.

40 • Identificación del signo de resistencia del patógeno identificado a un agente de control comparando las secuencias de ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con el al menos un marcador de resistencia identificado y la secuencia sin resistencia.

45 • En el caso de que una secuencia o un número de secuencias que sea mayor o igual que un número mínimo no coincida ni con el al menos un marcador de resistencia ni con la secuencia sin resistencia: Emisión de un aviso de que se ha identificado un patógeno en la muestra que presenta una mutación que indica una resistencia nueva y/o en desarrollo.

50 Incluso si se ha detectado un patógeno en una muestra, pero no se conoce ninguna resistencia del mismo, se puede iniciar la segunda fase de secuenciación, por ejemplo, para analizar la secuencia objetivo en el patógeno y, si es necesario, identificar mutaciones que indiquen el desarrollo de resistencia. En tal caso, las secuencias determinadas de nucleótidos o aminoácidos no se comparan con el marcador de resistencia, sino con la secuencia objetivo. La secuencia objetivo es también una secuencia de referencia. La secuencia objetivo, la secuencia sin resistencia y el marcador de referencia también se denominan en esta descripción secuencia indicadora de resistencia, ya que la resistencia o la ausencia de resistencia puede determinarse a partir de este segmento de secuencia.

55 Una realización preferida de la presente invención comprende las siguientes etapas:

60 • Recogida de una muestra de una planta o de un medio en el que crece la planta.

• Identificación de un patógeno en la muestra.

• Determinación de una secuencia objetivo para el patógeno identificado.

65

- Identificación de signos de una resistencia nueva del patógeno identificado a un agente de control al comparar las secuencias de ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con la secuencia objetivo.

5                   • En el caso de que una secuencia o un número de secuencias que sea mayor o igual que un número mínimo represente una mutación de la secuencia objetivo. Emisión de un aviso de que se ha identificado un patógeno en la muestra que presenta una mutación que indica una resistencia nueva y/o en desarrollo.

10               En una realización preferida, se determina la prevalencia  $Q_R$  de ácidos nucleicos o péptidos encontrados en una muestra con una secuencia de acuerdo con el marcador de resistencia, y se determina la prevalencia  $Q_{NR}$  de ácidos nucleicos o péptidos encontrados en la muestra con una secuencia de acuerdo con la secuencia sin resistencia. Las prevalencias determinadas  $Q_R$  y  $Q_{NR}$  pueden expresarse como una relación (por ejemplo,  $Q_R/Q_{NR}$ ). Es concebible que sólo se asuma que existe una señal de resistencia cuando la relación ha superado un valor mínimo predefinido. El valor mínimo puede determinarse empíricamente.

15               Una realización preferida de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- Recogida de una muestra de una planta o de un medio en el que crece la planta.

20                   • Identificación de un patógeno en la muestra.

- Determinación de al menos un marcador de resistencia para el patógeno identificado y determinación de una secuencia sin resistencia para el patógeno identificado.

25                   • Comparación de las secuencias de ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con el al menos un marcador de resistencia determinado y la secuencia sin resistencia.

30                   • Determinación de una prevalencia  $Q_R$  de ácidos nucleicos o péptidos encontrados en la muestra con una secuencia de acuerdo con el marcador de resistencia, determinación de una prevalencia  $Q_{NR}$  de ácidos nucleicos o péptidos encontrados en la muestra con una secuencia de acuerdo con la secuencia sin resistencia, cálculo de una relación de las prevalencias determinadas  $Q_R$  y  $Q_{NR}$ , y comparación de la relación con un valor mínimo predefinido.

35                   • En el caso de que la relación sea mayor o igual al valor mínimo: emisión de un aviso indicando que se ha encontrado un signo de resistencia para el patógeno identificado y emisión de un aviso de la resistencia.

40               Para la comparación de las secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de péptidos con el al menos un marcador de resistencia y/o la secuencia sin resistencia y/o la secuencia objetivo, lo que se aplica en esta descripción para la comparación de las secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de péptidos con la al menos una secuencia de patógeno puede aplicarse de forma análoga:

45                   • Para llevar a cabo la segunda fase de secuenciación de la forma más eficiente posible y evitar que una gran parte de la secuenciación recaiga en ácidos nucleicos o péptidos de la planta o en secuencias no objetivo del patógeno, también se puede detener la secuenciación de ácidos nucleicos o péptidos individuales en la segunda fase de secuenciación, en cuanto resulte evidente que un ácido nucleico o péptido que acaba de secuenciarse no puede proceder de una secuencia objetivo del patógeno (porque la sucesión determinada no se presenta en ninguna secuencia objetivo del patógeno).

50                   • El al menos un marcador de resistencia y/o la secuencia sin resistencia están presentes preferentemente como un índice FM.

55                   • La unidad de control y cálculo puede cargar el al menos un marcador de resistencia y/o la secuencia sin resistencia en una memoria de trabajo, y recibir la sucesión de nucleótidos (creciente) o la sucesión de aminoácidos (creciente) durante su determinación y compararla con el al menos un marcador de resistencia y/o con la secuencia sin resistencia.

60               Las salidas de información y/o avisos al realizar la presente invención pueden, por ejemplo, ser en forma de imágenes y/o texto y/o voz. La información y/o los avisos pueden visualizarse en una pantalla (monitor), imprimirse a través de una impresora, almacenarse en una memoria de datos y/o transmitirse a otro ordenador a través de una red.

65               La información sobre un agente patógeno que ha sido identificado puede ser, por ejemplo, el nombre del agente patógeno. También se puede emitir información sobre la muestra en la que se encontró el patógeno y/o dónde y/o en qué momento se realizó el muestreo y/o de qué planta se tomó la muestra.

La información sobre una resistencia que ha sido identificada puede incluir el nombre de la resistencia, el objetivo afectado por la resistencia y/o el nombre de uno o más agentes de control o una o más sustancias activas a las que el patógeno identificado es resistente.

5

El resultado del análisis de la muestra de una planta de acuerdo con la invención puede utilizarse de diferentes maneras. En el caso de que se haya identificado un patógeno en el que no se hayan encontrado signos de la presencia de resistencia o de la aparición de una nueva resistencia, se podrán identificar uno o varios agentes de control que puedan utilizarse para controlar el patógeno. En el caso de que se haya identificado un agente patógeno para el que se hayan encontrado signos de la presencia de una resistencia conocida, se pueden nombrar agentes de control para los que no se manifieste la resistencia. Este agente de control también puede consistir en el uso de energía eléctrica, energía térmica (por ejemplo, en forma de vapor de agua o flameado térmico), radiación electromagnética (radiación UV, irradiación láser) y/o medios mecánicos para eliminar la planta o las partes de la planta infectadas.

10

15

Dado que la invención también puede llevarse a cabo mediante un sistema autónomo *in situ* en el campo, el sistema de acuerdo con la invención también puede comprender un dispositivo de control para controlar agentes patógenos que, tras la selección (automatizada) del agente de control para controlar el patógeno identificado, puede aplicar automáticamente el agente de control seleccionado.

20

El resultado del análisis de patógenos y resistencias de acuerdo con la invención también puede registrarse en un mapa de patógenos. Dicho "mapa de patógenos" es una representación de una parte de la superficie terrestre en la que, para varios lugares de la superficie terrestre, se ha registrado información sobre si se ha observado un patógeno en el lugar correspondiente y si se ha descubierto que el patógeno tiene un signo de resistencia (existente, en desarrollo o posible) a un agente de control. Preferentemente, el mapa de patógenos es un mapa de patógenos digital.

25

El término "digital" significa que el mapa puede ser procesado por una máquina, usualmente un sistema informático.

30

Por "procesamiento" se entienden los métodos conocidos de procesamiento electrónico de datos (PED).

Preferentemente, el mapa de patógenos digital es una representación digital de un campo o de un campo que incluye campos vecinos o una región. Preferentemente, se generan mapas de patógenos separados para patógenos individuales y/o para agentes de control individuales o grupos de agentes de control que tienen la misma sustancia activa o son de la misma clase química/biológica (por ejemplo, una clase estructural química) o tienen el mismo mecanismo de acción o el mismo sitio de acción (objetivo), y/o para plantas específicas en las que puede aparecer el patógeno. Preferentemente, los mapas de patógenos digitales separados pueden combinarse, es decir, superponerse virtualmente.

35

40

En una realización preferida, para cada lugar en el mapa digital de patógenos para el que se dispone de uno o más resultados de análisis, se almacena el momento o momento en los que se realizó el análisis respectivo.

En una realización preferida, varios mapas de patógenos digitales se combinan de tal manera que muestran un desarrollo temporal de la distribución de una o más resistencias.

45

Preferentemente, los mapas de patógenos digitales pueden combinarse con otros mapas digitales; por ejemplo, con mapas digitales de las condiciones del suelo, del balance hídrico, de los cultivos, de las temperaturas (en momentos definidos y/o para intervalos de tiempo definidos, por ejemplo en forma de temperaturas promedio y/o mínimas y/o máximas) la cantidad de precipitaciones (en momentos definidos y/o durante intervalos de tiempo definidos, por ejemplo en forma de cantidades de precipitaciones promedio y/o mínimas y/o máximas), la radiación solar, los movimientos de la masa de aire (direcciones y velocidades del viento), las infecciones pasadas con uno o más agentes patógenos, las medidas agrícolas que se han llevado a cabo (por ejemplo, siembra, riego, arado, aplicación de productos fitosanitarios, aplicación de nutrientes, etc.) entre otros. Los valores de los parámetros registrados en un mapa digital pueden ser valores medidos y/o valores previstos.

50

55

Por ejemplo, un mapa de patógenos puede proporcionar a un agricultor información valiosa sobre las zonas de su campo (o campos) en las que hay patógenos y qué resistencias están presentes o se están propagando. Los patrones de distribución pueden analizarse para explorar las causas de la aparición y/o propagación de patógenos y/o resistencias. Con varios análisis consecutivos, el agricultor obtiene información sobre la propagación de patógenos y/o resistencias. De esta manera podrá tomar medidas para combatir los agentes patógenos y/o la resistencia. En un mapa de patógenos, el agricultor también puede ver si se ha observado una infección con patógenos (resistentes) en campos vecinos. La información puede ayudarle a tomar medidas preventivas para sus campos.

60

65

Además, los mapas de patógenos digitales más detallados generados casi en tiempo real en combinación con otros datos, como la radiación solar, la temperatura, la humedad y la dirección del viento, permiten predecir con

mayor exactitud la propagación de patógenos resistentes y no resistentes. Esto posibilita un control específico o un tratamiento profiláctico de las zonas vecinas, así como un uso más selectivo de los agentes de control.

5 Además, la recogida selectiva de información genética de poblaciones de patógenos en el medio ambiente permite evaluar el desarrollo inminente de resistencia a un agente de control específico.

10 En otra etapa del método de acuerdo con la invención, se puede recomendar y/o llevar a cabo una acción para controlar un agente patógeno y/o una resistencia (en desarrollo) (basándose en el mapa de patógenos). En primer lugar, basándose en el patógeno identificado en la muestra, se pueden identificar uno o varios agentes de control para combatir el patógeno. Esto puede hacerse, por ejemplo, consultando una o varias bases de datos. La información sobre los agentes de control y los patógenos contra los que se utilizan puede almacenarse en una o varias bases de datos. En el caso de que el patógeno identificado muestre resistencia, se puede llevar a cabo una segunda etapa para comprobar si existe resistencia a uno o más de los agentes de control identificados a partir de la al menos una base de datos. Se puede identificar el agente o agentes de control a los que el patógeno identificado no es resistente. A continuación, las plantas pueden tratarse con el agente de control o los agentes de control identificados. Si el patógeno es resistente a todos los agentes de control identificados a partir de la al menos una base de datos, podrán identificarse, proponerse y/o llevarse a cabo medidas alternativas para controlar los patógenos y/o la propagación de una enfermedad, tales como: eliminación mecánica completa de las plantas afectadas, rotación de cultivos, flameado, eliminación por frío, eliminación por energía eléctrica, eliminación por energía electromagnética (por ejemplo, por luz ultravioleta, luz de láser) y/o similares.

25 La presente invención puede llevarse a cabo en su totalidad o en parte con un sistema informático. Un "sistema informático" es un sistema de procesamiento electrónico de datos que los procesa mediante reglas de cálculo programables. Un sistema de este tipo suele comprender una unidad de control y cálculo, a menudo denominada también "ordenador", que incluye un procesador para realizar operaciones lógicas y una memoria de trabajo para cargar un programa informático, así como periféricos.

30 En informática, los "periféricos" son todos los dispositivos que se conectan al ordenador y sirven para controlarlo y/o como dispositivos de entrada y salida. Algunos ejemplos incluyen el monitor (pantalla), la impresora, el escáner, el ratón, el teclado, la palanca de mando, las unidades de disco, la cámara, el micrófono, los altavoces, etc. Las conexiones internas y las tarjetas de expansión también se consideran periféricos en informática.

35 Los sistemas informáticos actuales suelen dividirse en PC de escritorio, PC portátiles, ordenadores portátiles, notebooks y netbooks, tabletas PC y los denominados dispositivos portátiles (por ejemplo, teléfonos inteligentes); todos estos sistemas pueden utilizarse para llevar a cabo la invención.

40 Las entradas al sistema informático (por ejemplo, para el control por parte de un usuario) se realizan a través de medios de entrada como un teclado, un ratón, un micrófono, una pantalla táctil y/o similares. Las salidas se realizan a través de una o varias unidades de salida, que pueden ser un monitor (pantalla), una impresora y/o una memoria de datos.

45 La invención se explica con más detalle a continuación con referencia a realizaciones y figuras específicas, sin pretender limitar la invención a estos ejemplos, las características mostradas en los ejemplos y/o combinaciones de las características.

Se muestra:

50 La figura 1 muestra esquemáticamente una realización del sistema de acuerdo con la invención. El sistema (10) comprende una unidad de muestreo (11), una unidad de secuenciación (12), una unidad de control y cálculo (13), una memoria de datos (14) y una unidad de salida (15).

La unidad de muestreo (11) puede utilizarse para tomar una muestra de una planta P o de un medio en el que crece la planta P. La muestra puede procesarse e introducirse en la unidad de secuenciación (12).

55 La unidad de secuenciación (12) se utiliza para determinar secuencias de ácidos nucleicos presentes en la muestra.

60 La unidad de control y cálculo (13) se utiliza para controlar los componentes individuales del sistema (10) de acuerdo con la invención y para coordinar los flujos de datos y señales. La unidad de control y cálculo puede ser un ordenador de propósito general que ha sido configurado mediante el programa informático de acuerdo con la invención para llevar a cabo las etapas que se describen en el presente documento.

La unidad de control y cálculo (13) está conectada a la memoria de datos (14), de la que puede recuperar una o más secuencias de patógeno y una o más secuencias indicadoras de resistencia con el propósito de realizar comparaciones.

65

La unidad de control y cálculo (13) recibe secuencias crecientes de ácidos nucleicos de la unidad de secuenciación (12).

5 En una primera fase, la unidad de control y cálculo (13) comprueba si las secuencias crecientes están contenidas en una o varias secuencias de patógeno. En cuanto se establece que una secuencia creciente de un ácido nucleico no está contenida en la al menos una secuencia de patógeno, la unidad de control y cálculo (13) envía una señal a la unidad de secuenciación (12). La señal detiene la secuenciación del ácido nucleico y se inicia la secuenciación de un nuevo ácido nucleico. En cuanto se detecta que la secuencia de un ácido nucleico coincide con una secuencia de patógeno, la unidad de control y cálculo (13) hace que la unidad de salida (15) emita información sobre el patógeno con cuya secuencia coincide la secuencia del ácido nucleico. Además, la unidad de control y cálculo (13) pasa a una segunda fase.

15 En la segunda fase, la unidad de control y cálculo (13) comprueba si las secuencias crecientes de los ácidos nucleicos de la muestra coinciden con un marcador de resistencia, una secuencia sin resistencia y/o una secuencia objetivo. En cuanto se detecta que la secuencia de un ácido nucleico coincide con una secuencia indicadora de resistencia, la unidad de control y cálculo (13) hace que la unidad de salida (15) emita información sobre la resistencia.

20 La figura 2 muestra esquemáticamente y a modo de ejemplo en forma de diagrama de flujo las etapas que lleva a cabo un ordenador en cuya memoria de trabajo está cargado el programa informático de acuerdo con la invención. Las etapas se dividen en dos fases F1 y F2. Las etapas (201), (202), (203), (204), (205) y (206) se asignan a la primera fase. Las etapas (208), (209), (210), (211), (212), (213) y (214) se asignan a la segunda fase. La etapa (207) se asigna a la primera fase y conduce a un cambio de la primera fase F1 a la segunda fase F2. El ordenador comienza a ejecutar las etapas de la fase F1 y pasa a la fase F2 si se cumplen las condiciones definidas (véase más adelante).

(201) El ordenador carga varias secuencias de patógeno  $SP$  de una memoria de datos.

(202) El ordenador recibe una secuencia creciente  $S$  de un ácido nucleico.

(203) El ordenador comprueba si la secuencia creciente  $S$  está contenida en las secuencias de patógeno  $SP$  ( $\zeta S \in SP?$ ).

(206) En el caso de que la secuencia creciente  $S$  no esté contenida en ninguna de las secuencias de patógeno  $SP$ , el ordenador envía una señal que conduce a que se detenga la secuenciación del ácido nucleico que se está siendo secuenciado. En su lugar, se secuencian un nuevo ácido nucleico y el ordenador recibe una secuencia creciente  $S$  del nuevo ácido nucleico.

(204) Si una secuencia creciente  $S$  está contenida en una secuencia de patógeno  $SP$ , se comprueba si puede suponerse, basándose en la información disponible, que la secuencia  $S$  puede asignarse a un patógeno específico de  $SP$  ( $\zeta S = SP?$ ).

(205) En el caso de que la información disponible aún no sea suficiente para concluir que la secuencia procede de un patógeno específico, se continúa con la secuenciación del ácido nucleico.

(207) En el caso de que la información disponible sea suficiente para concluir que la secuencia procede de un patógeno específico, el patógeno se identifica en la muestra correspondiente. Se puede emitir información sobre el patógeno y el ordenador envía una señal que hace que se detenga la secuenciación del ácido nucleico que está siendo secuenciado. Además, el sistema pasa a la segunda fase F2 de secuenciación.

(208) El ordenador carga al menos una secuencia indicadora de resistencia  $R$  para el patógeno identificado desde una memoria de datos, en donde la al menos una secuencia indicadora de resistencia puede comprender un marcador de resistencia, una secuencia sin resistencia y/o una secuencia objetivo.

(209) El ordenador recibe una nueva secuencia creciente  $S$  de un ácido nucleico.

(210) El ordenador comprueba si la secuencia creciente  $S$  está contenida en la al menos una secuencia indicadora de resistencia  $R$  ( $\zeta S \in R?$ ).

(213) En el caso de que la secuencia creciente  $S$  no esté contenida en ninguna secuencia indicadora de resistencia, el ordenador envía una señal que hace que se detenga la secuenciación del ácido nucleico que está siendo secuenciado. En su lugar, se secuencian un nuevo ácido nucleico y el ordenador recibe una secuencia creciente  $S$  del nuevo ácido nucleico.

(211) Si la secuencia creciente S está contenida en la secuencia indicadora de resistencia R, se comprueba si puede suponerse, basándose en la información disponible, que el patógeno tiene la resistencia correspondiente ( $\zeta S=R?$ ).

5 (212) En el caso de que la información disponible aún no sea suficiente para concluir que el patógeno tiene la resistencia, se continúa con la secuenciación del ácido nucleico.

(214) En el caso de que la información disponible sea suficiente para afirmar que el agente patógeno presenta la resistencia actual, se emite información sobre la resistencia.

10 La figura 3 muestra esquemáticamente otra realización del sistema de acuerdo con la invención. El sistema (10) comprende una unidad de secuenciación (12), una unidad de control y cálculo (13), una memoria de datos (14) y una unidad de salida (15).

15 La unidad de control y cálculo (13) y la unidad de salida (15) son componentes de un sistema informático estándar, por ejemplo, un ordenador portátil. La unidad de control y cálculo (13) recibe datos de la unidad de secuenciación (12), los datos representan secuencias crecientes de nucleótidos o aminoácidos. La unidad de control y cálculo (13) también está conectada a la base de datos (14) a través de una red (por ejemplo, Internet, representada en este caso con una nube (C)). Es concebible que haya varias bases de datos. También es concebible que una base de datos forme parte del sistema informático. La unidad de control y cálculo (13) obtiene al menos una secuencia de patógeno y, opcionalmente, al menos una secuencia indicadora de resistencia de la al menos una base de datos.

20 Es concebible que la al menos una base de datos también pueda proporcionar datos sobre condiciones ambientales, datos sobre agentes de control, datos sobre plantas y variedades vegetales, datos sobre patógenos y/o similares. Además, es concebible que la al menos una base de datos almacene uno o más modelos para calcular la probabilidad de aparición de un patógeno en una planta en el momento actual basándose en la información sobre la planta y/o las condiciones ambientales, modelo(s) que puede(n) ser recuperado(s) por la unidad de control y cálculo (13) y utilizado(s) para fines de cálculo.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método que comprende las etapas de:
- Recogida de una muestra de una planta (P) o de un medio en el que crece la planta (P),
  - identificación de un patógeno en la muestra,
  - 10 - identificación de signos de resistencia del patógeno a un agente de control,
- en donde la identificación del patógeno y la identificación de los signos de resistencia se realiza secuenciando ácidos nucleicos individuales o péptidos individuales de la muestra, en donde las secuencias de nucleótidos o las secuencias de aminoácidos se determinan al secuenciar los ácidos nucleicos individuales o los péptidos
- 15 individuales, en donde las secuencias de nucleótidos o las secuencias de aminoácidos se comparan con secuencias de referencia,
- caracterizado por que** la secuenciación se realiza en dos fases, una primera fase (F1) y una segunda fase (F2),
- 20 - en donde en la primera fase (F1) durante la secuenciación de cada ácido nucleico o cada péptido, la secuencia determinada (S) respectiva se compara con al menos una secuencia de patógeno (SP), y
  - en el caso de que la secuencia determinada (S) no coincida con la al menos una secuencia de patógeno (SP), se detiene la secuenciación posterior de este ácido nucleico o este péptido,
  - 25 ▪ en el caso de que la secuencia determinada (S) coincida con una secuencia de patógeno (SP), se determina un patógeno que tiene la secuencia de patógeno (SP), y se determina al menos un marcador de resistencia basándose en el patógeno determinado, y se pasa a la segunda fase (F2),
  - 30 • en donde, en la segunda fase (F2), las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra se comparan con el al menos un marcador de resistencia determinado y/o con una secuencia sin resistencia, en donde una secuencia sin resistencia es una sucesión de nucleótidos o una sucesión de aminoácidos de un patógeno que no muestra signos de resistencia del patógeno a un agente de control.
- 35 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
- Determinación de una planta (P),
  - identificación de al menos un patógeno que puede infectar la planta (P),
  - 40 - determinación de al menos una secuencia de patógeno (SP) para el al menos un patógeno determinado,
  - recogida de una muestra de la planta (P) o de un medio en el que crece la planta (P),
  - 45 - identificación de un patógeno en la muestra,
  - determinación de al menos un marcador de resistencia para el patógeno identificado,
  - identificación de signos de resistencia del patógeno identificado a un agente de control.
  - 50
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
- Determinación de una planta (P),
  - 55 - determinación de las condiciones ambientales a las que está y/o ha estado expuesta la planta (P),
  - identificación de al menos un patógeno que puede infectar la planta (P),
  - determinación de al menos una secuencia de patógeno (SP) para el al menos un patógeno determinado,
  - 60 - recogida de una muestra de la planta (P) o de un medio en el que crece la planta (P),
  - identificación de un patógeno en la muestra,
  - 65 - determinación de al menos un marcador de resistencia para el patógeno identificado,

- identificación de signos de resistencia del patógeno identificado a un agente de control.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de:

5 - Determinación de una planta (P),

- identificación de al menos un patógeno que puede infectar la planta (P),

- determinación de las condiciones ambientales a las que está o ha estado expuesta la planta (P),

10 - cálculo de una probabilidad de aparición de al menos un patógeno en la planta (P) en el momento actual,

- comparación de la probabilidad con un valor umbral predefinido,

15 - determinación de las secuencias de patógeno (SP) de los patógenos identificados cuya probabilidad sea superior al valor umbral,

- recogida de una muestra de la planta (P) o de un medio en el que crece la planta (P),

20 - identificación de un patógeno en la muestra,

- determinación de al menos un marcador de resistencia para el patógeno identificado,

- identificación de signos de resistencia del patógeno identificado a un agente de control.

25 5. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa de identificación de signos de resistencia del patógeno identificado a un agente de control comprende las siguientes subetapas:

30 - Comparación de las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con el al menos un marcador de resistencia determinado;

- en el caso de que el marcador de resistencia no aparezca en ninguna de las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra: emisión de un aviso de que no se ha encontrado ningún signo de resistencia para el patógeno identificado,

35 - en el caso de que el marcador de resistencia aparezca en una o más de las secuencias: emisión de un aviso indicando que se ha encontrado un signo de resistencia para el patógeno identificado y emisión de un aviso de la resistencia.

40 6. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa de identificación de signos de resistencia del patógeno identificado a un agente de control comprende las siguientes subetapas:

- Comparación de las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con el al menos un marcador de resistencia determinado;

45 - en el caso de que el marcador de resistencia no aparezca en ninguna de las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra o aparezca en un número de ácidos nucleicos inferior a un número mínimo predefinido: emisión de un aviso de que no se ha encontrado ningún signo de resistencia para el patógeno identificado,

50 - en el caso de que el marcador de resistencia aparezca en un número mínimo de secuencias o en un número superior al número mínimo: emisión de un aviso indicando que se ha encontrado un signo de resistencia para el patógeno identificado y emisión de un aviso de la resistencia.

7. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las etapas de:

55 - Recogida de una muestra de una planta (P) o de un medio en el que crece la planta (P),

- identificación de un patógeno en la muestra,

60 - determinación de al menos un marcador de resistencia para el patógeno identificado y determinación de una secuencia sin resistencia para el patógeno identificado,

- identificación del signo de resistencia del patógeno identificado a un agente de control comparando las secuencias de ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con el al menos un marcador de resistencia identificado y la secuencia sin resistencia;

65

- en el caso de que una secuencia o un número de secuencias que sea mayor o igual que un número mínimo no coincida ni con el al menos un marcador de resistencia ni con la secuencia sin resistencia: emisión de un aviso de que se ha identificado un patógeno en la muestra que presenta una mutación que indica una resistencia nueva y/o en propagación.

5

8. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las etapas de:

- Recogida de una muestra de una planta (P) o de un medio en el que crece la planta (P),

10

- identificación de un patógeno en la muestra,

- determinación de una secuencia objetivo para el patógeno identificado,

15

- identificación de signos de una resistencia nueva del patógeno identificado a un agente de control al comparar las secuencias de ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con la secuencia objetivo;

- en el caso de que una secuencia o un número de secuencias que sea mayor o igual que un número mínimo represente una mutación de la secuencia objetivo: emisión de un aviso de que se ha identificado un patógeno en la muestra que presenta una mutación que indica una resistencia nueva y/o en propagación.

20

9. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las etapas de:

- Recogida de una muestra de una planta (P) o de un medio en el que crece la planta (P),

25

- identificación de un patógeno en la muestra,

- determinación de al menos un marcador de resistencia para el patógeno identificado y determinación de una secuencia sin resistencia para el patógeno identificado,

30

- comparación de las secuencias de ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con el al menos un marcador de resistencia determinado y la secuencia sin resistencia,

- determinación de una prevalencia  $Q_R$  de ácidos nucleicos o péptidos encontrados en la muestra con una secuencia de acuerdo con el marcador de resistencia, determinación de una prevalencia  $Q_{NR}$  de ácidos nucleicos o péptidos encontrados en la muestra con una secuencia de acuerdo con la secuencia sin resistencia, cálculo de una relación de las prevalencias determinadas  $Q_R$  y  $Q_{NR}$ , y comparación de la relación con un valor mínimo predefinido;

35

- en el caso de que la relación sea mayor o igual al valor mínimo: emisión de un aviso indicando que se ha encontrado un signo de resistencia para el patógeno identificado y emisión de un aviso de la resistencia.

40

10. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la muestra de la planta (P) es una o varias hojas de la planta (P).

45

11. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la planta (P) se encuentra en el macroestadio 1 o 2 o 3 a 6 de acuerdo con la escala BBCH.

12. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la secuencia de patógeno (SP) es una sucesión de nucleótidos de ADN de un hongo, bacteria o virus.

50

13. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además las etapas de:

- Creación y/o actualización de un mapa de patógenos, en donde se registra un lugar en el que se ha recogido la muestra de la planta (P), en donde se indica si se ha identificado un patógeno en la planta (P) en ese lugar y, en caso de que se haya identificado un patógeno en la planta (P), si el patógeno tiene resistencia a un agente de control, y

55

- emisión del mapa de patógenos, preferentemente en una pantalla y/o en una impresora, y/o transmisión del mapa de patógenos a un dispositivo para la ejecución automática de una acción para controlar el agente patógeno identificado.

60

14. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además las etapas de:

- Determinación de un agente de control para controlar el patógeno identificado, teniendo en cuenta la resistencia posiblemente identificada,

65

- realizar una acción para controlar el patógeno en la planta utilizando el agente de control identificado.

15. Sistema (10) que comprende

5 - una unidad de secuenciación (12),

- una unidad de control y cálculo (13) y

10 - al menos una memoria de datos (14) en la que se almacenan al menos una secuencia de patógeno (SP) y al menos un marcador de resistencia para al menos un patógeno,

en donde la unidad de secuenciación (12) está configurada para secuenciar ácidos nucleicos o péptidos en una muestra de una planta (P) o de un medio en el que crece la planta (P), y de este modo determinar secuencias de nucleótidos o aminoácidos en la muestra,

15 en donde la unidad de secuenciación (12) está configurada para transmitir las secuencias determinadas en cada caso a la unidad de control y cálculo (13) durante la determinación de las secuencias,

20 **caracterizado por que** la unidad de control y cálculo (13) está configurada para comparar, en una primera fase (F1), cada secuencia transmitida (S) de un ácido nucleico o un péptido con al menos una secuencia de patógeno (SP), y

25 - en el caso de que una secuencia transmitida (S) no coincida con la al menos una secuencia de patógeno (SP), ordenar a la unidad de secuenciación (12) que detenga la secuenciación posterior del ácido nucleico respectivo o del péptido respectivo,

30 - en el caso de que una secuencia transmitida (S) coincida con una secuencia de patógeno (SP), determinar un patógeno que tiene la secuencia de patógeno (SP), y determinar al menos un marcador de resistencia basándose en el patógeno determinado, y pasar a una segunda fase (F2),

35 en donde la unidad de control y cálculo (13) está configurada para comparar, en la segunda fase (F2), las secuencias de los ácidos nucleicos o péptidos de la muestra con el al menos un marcador de resistencia determinado y/o una secuencia sin resistencia, en donde una secuencia sin resistencia es una sucesión de nucleótidos o una sucesión de aminoácidos de un patógeno que no tiene signos de resistencia del patógeno a un agente de control.

16. Medio (medio de almacenamiento) legible por ordenador que comprende instrucciones que, cuando son ejecutadas en un ordenador, hacen que el ordenador realice las siguientes etapas:

40 - para una pluralidad de ácidos nucleicos o péptidos: recepción de una sucesión creciente de nucleótidos o aminoácidos en el ácido nucleico o péptido respectivo desde una unidad de secuenciación (12);

**caracterizado por que** los comandos también hacen que el ordenador realice las siguientes etapas:

45 - en una primera fase (F1) durante la recepción de la sucesión creciente: comprobar si la sucesión de nucleótidos o aminoácidos está contenida una o más veces en al menos una secuencia de patógeno (SP);

50 - en el caso de que la sucesión no esté contenida en ninguna secuencia de patógeno (SP): transmitir una señal a la unidad de secuenciación (12) para detener la secuenciación posterior del ácido nucleico o péptido;

- en el caso de que la sucesión coincida con una secuencia de patógeno (SP): determinar un patógeno que tiene la secuencia de patógeno y determinar al menos un marcador de referencia, e iniciar una segunda fase (F2);

55 - en la segunda fase (F2): comparar las sucesiones de nucleótidos o aminoácidos con el al menos un marcador de referencia y/o una secuencia sin resistencia, en donde una secuencia sin resistencia es una sucesión de nucleótidos o una sucesión de aminoácidos de un patógeno que no muestra signos de resistencia del patógeno a un agente de control.

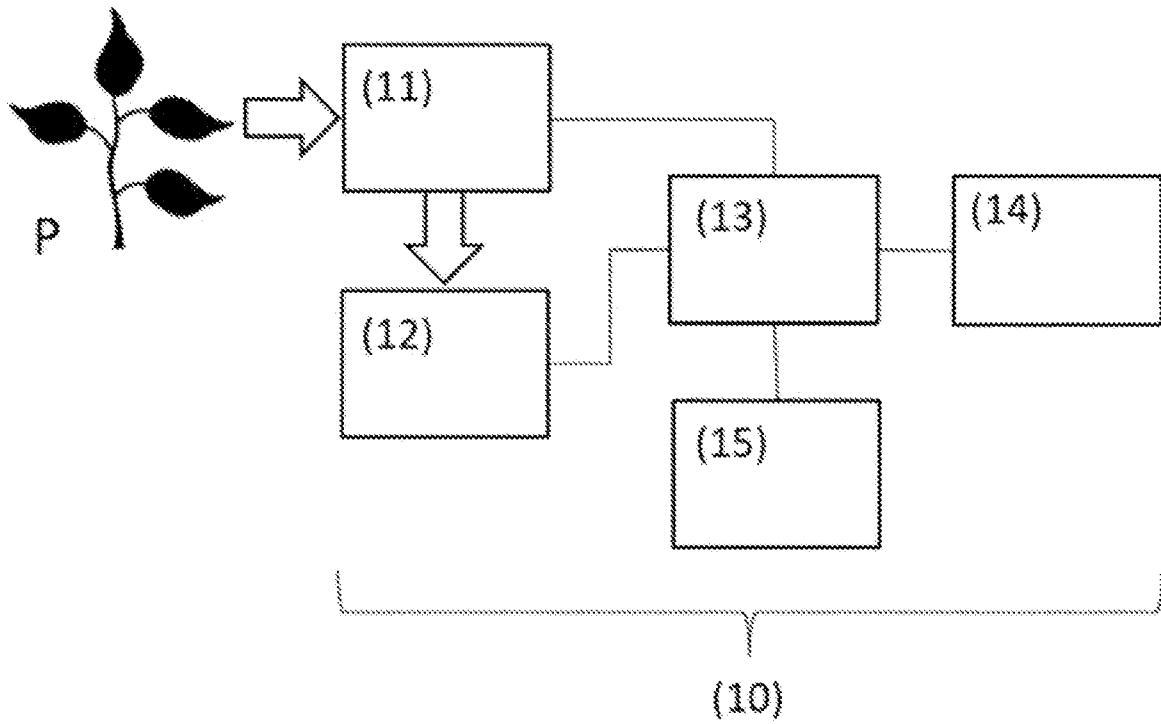


Figura 1

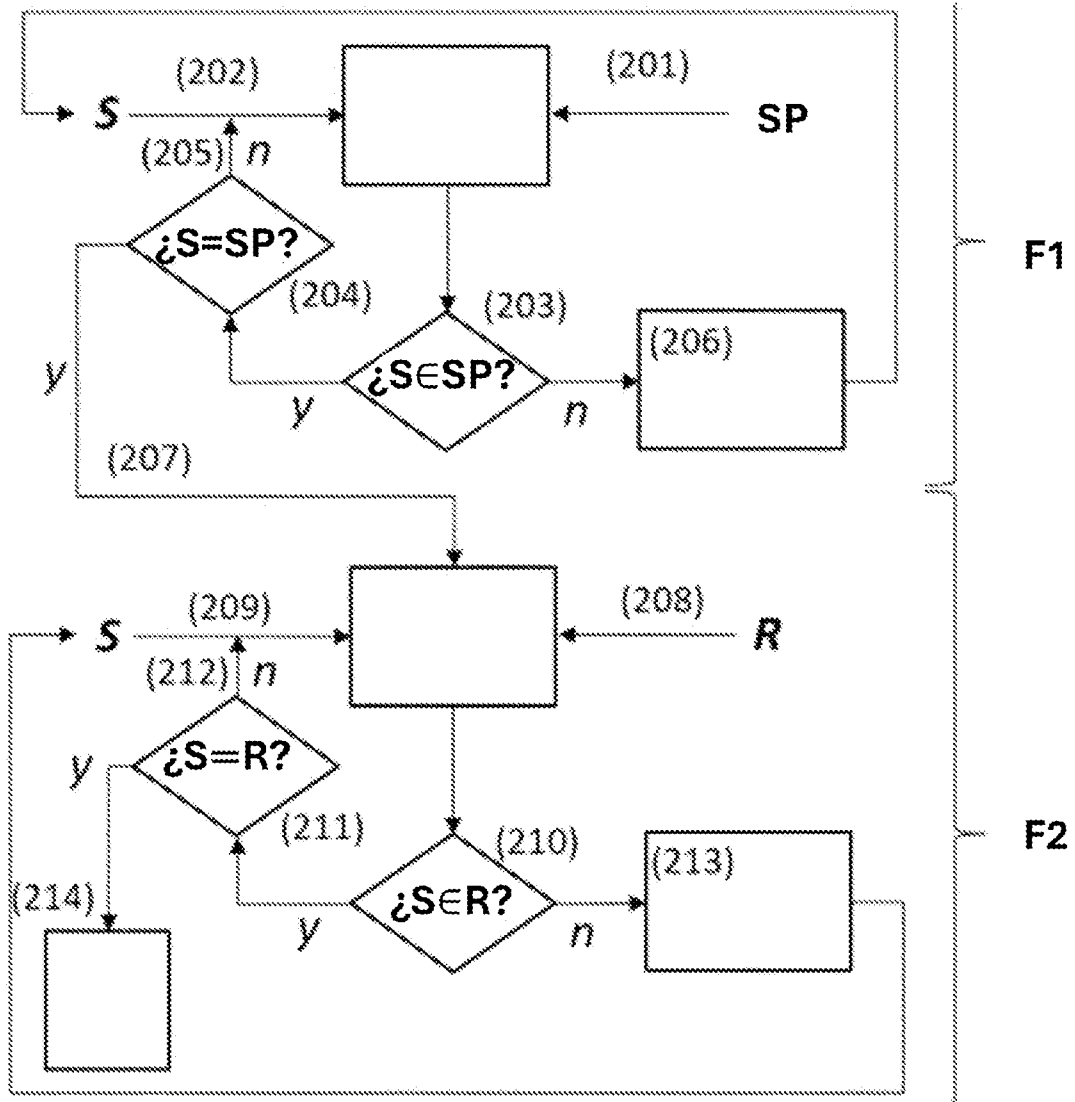


Figura 2

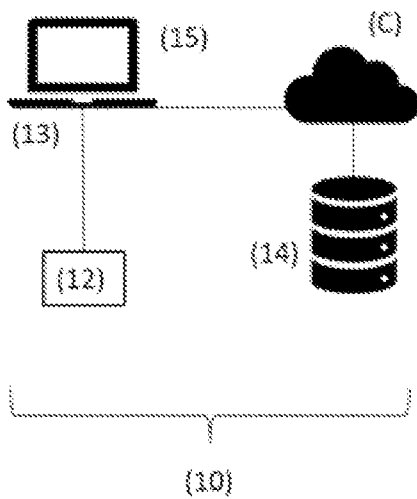


Figura 3