

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 617**

21 Número de solicitud: 201000535

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **21.04.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
20.12.2011

71 Solicitante/s: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES
IVIA

72 Inventor/es: **Matas Casado, Isabel;**
Pérez Martínez, Isabel;
Penyalver Navarro, Ramón;
López González, María Milagros y
Ramos Rodríguez, Cayo Juan

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Conjunto de cebadores, procedimiento y kit para el diagnóstico y la tipificación de la bacteria patógena causante de la tuberculosis del olivo, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.**

57 Resumen:

Conjunto de cebadores, procedimiento y kit para el diagnóstico y la tipificación de la bacteria patógena causante de la tuberculosis del olivo, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

La presente invención permite el diagnóstico (amplificación por PCR de una muestra de ADN usando un conjunto de cebadores reivindicado, digestión mediante una enzima de restricción de los productos resultantes, y análisis de los fragmentos resultantes mediante electroforesis) y la tipificación (amplificaciones por PCR de una muestra de ADN diagnosticada usando los conjuntos de cebadores reivindicados, y análisis de los productos finales mediante electroforesis) de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, agente causante de la tuberculosis del olivo. Las principales ventajas de la presente invención son: el uso de cebadores no fluorescentes, lo que evita la utilización de equipamiento especializado y de alto coste, así como más estables y eficaces; y la obtención de resultados fácilmente analizables electroforesis en gel y consecuentemente diagnósticos más específicos.

ES 2 370 617 A1

DESCRIPCIÓN

Conjunto de cebadores, procedimiento y kit para el diagnóstico y la tipificación de la bacteria patógena causante de la tuberculosis del olivo, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores, procedimiento y kit para el diagnóstico y tipificación de bacterias patógenas del olivo, y más concretamente para el diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, agente causante de la tuberculosis del olivo.

10

Estado de la técnica

En paralelo a la generación de un mercado creciente de consumidores de aceite de oliva en todo el mundo, la superficie dedicada a este cultivo también aumenta, no únicamente en los países mediterráneos donde el cultivo del olivo juega desde hace siglos un papel económico, nutricional, cultural, social y medioambiental, sino también en regiones tan alejadas del origen del cultivo como California, Argentina, Australia (Hall *et al.*, 2004) o Nueva Zelanda (Taylor *et al.*, 2001).

20

La Unión Europea (UE) es el principal productor mundial de aceite de oliva, ya que supera el 75% de la producción mundial. Dentro de la UE, España, Italia y Grecia generan más del 98% de la producción. La superficie del olivar en estos tres países representa alrededor del 49% de la superficie mundial y suministra más del 77% de la producción total de aceite, demostrando su alto nivel de rendimiento (FAO, 2005). Datos de la campaña 2007 indican que la superficie olivarera total en España es de 2.456.719 hectáreas dedicadas principalmente a la producción de aceite de oliva, de las cuales en este mismo año, Andalucía cultiva aproximadamente un 61% de la superficie total con un porcentaje del 82% de la producción total de aceite de oliva (Datos del informe nº 4 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2007).

25

Con el objetivo fundamental de mantener y potenciar su posición en el mercado mundial, la política actual de la UE se dirige a fomentar la producción de un producto de gran calidad que redunde en beneficio de los agricultores, transformadores, comerciantes y consumidores. Entre otras medidas, cabe destacar la elaboración de una *lista de organismos nocivos y enfermedades que afectan a la calidad del aceite manera significativa* (EU-Directive 92/34 reflejada en el ordenamiento jurídico español por el Real Decreto 1678/1999, de 29 de octubre: BOE 22238, 18 de Noviembre de 1999). En consecuencia, la comercialización de plantones de olivo requiere actualmente la certificar la ausencia de los patógenos incluidos en esta lista.

30

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* (Pss), único patógeno bacteriano del olivar incluido en la Directiva de la UE antes mencionada, es el agente causal de la tuberculosis del olivo. Los árboles afectados muestran tumores (hiperplasia del tejido vegetal conocida con el nombre de verrugas o agallas) que llegan a alcanzar varios centímetros de diámetro en troncos, ramas, tallos y brotes. En general, los árboles enfermos muestran menor vigor y reducción del crecimiento; cuando el ataque es muy intenso, los árboles terminan siendo improductivos (Trapero y Blanco, 1996). En España, Cuesta y Delgado (1995) han evaluado las pérdidas causadas por tuberculosis en 37.822 Tm anuales. Datos recientes procedentes del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) indican que la producción de olivos enfermos de tuberculosis disminuye con respecto a la de los olivos sanos (Quesada *et al.*, 2004).

40

Hasta la fecha, y debido a la ausencia de métodos eficaces de control de la tuberculosis se hace necesario establecer una estrategia de lucha preventiva, resultando para ello indispensable disponer de métodos de diagnóstico temprano que permitan determinar la presencia del agente patógeno, incluso en material vegetal asintomático. Por otro lado, la disponibilidad de métodos moleculares de tipificación de agentes patógenos, permitiría llevar a cabo estudios epidemiológicos, los cuales hasta la fecha son escasos para muchos de ellos, como por ejemplo *P. savastanoi*.

50

La formación de tumores en plantas de olivo y adelfa depende de la producción y secreción de las fitohormonas ácido indol-3-acético (IAA) y citoquininas (Cks) por parte de la bacteria (Smidt y Kosuge, 1978; Comai y Kosuge, 1980; Comai y Kosuge, 1982; Surico *et al.*, 1985a; MacDonald *et al.*, 1986; Iacobellis *et al.*, 1994). La producción de IAA en cepas de *P. savastanoi* ocurre mediante la conversión del triptófano en indolacetamida (IAM), llevada a cabo por la enzima triptófano monooxigenasa (producto del gen *iaaM*) y, posteriormente, por la conversión del IAM en IAA, mediante la actividad de la indolacetamida hidrolasa (producto del gen *iaaH*) (Magie *et al.*, 1963; Kosuge *et al.*, 1966). Además, *P. savastanoi* es capaz de transformar el IAA en el conjugado IAA-lisina mediante la actividad ino 1-3-acetil-L-lisina sintetasa, cuya actividad está codificada por el gen *iaaL* (Hutzinger y Kosuge, 1968; Glass y Kosuge, 1986a). Estudios de expresión génica en *P. savastanoi*, demostraron que la expresión de los genes *iaaM* e *iaaH* es constitutiva e independiente de la concentración de triptófano presente en el medio (Gaffney *et al.*, 1990). Por lo tanto, el aumento de la concentración intracelular de triptófano conduce a una sobreproducción de IAA, que provoca una mayor severidad en los síntomas ocasionados por la bacteria (Kuo y Kosuge, 1969; Smidt y Kosuge, 1978). Por el contrario, mutantes defectivos en la producción de IAA son incapaces de formar tumores completos en la planta hospedadora (Iacobellis *et al.*, 1994).

65

La aplicación de técnicas de PCR en el estudio de patógenos vegetales ha permitido la detección y caracterización de bacterias fitopatógenas con gran fiabilidad y relativa sencillez, destacando su sensibilidad y especificidad alcanzadas. La primera aplicación de PCR al diagnóstico de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* fue desarrollada por Penyalver y colaboradores (2000). Este método se basa en el enriquecimiento previo de la población de este patógeno en medios semiselectivos de cultivo, seguido de una PCR en la que se utilizan cebadores específicos del gen *iaaL* que amplifican un fragmento interno de 454 pb. Para ello, se utilizan dos oligonucleótidos, denominados IAAL-F e IAAL-R (Penyalver *et al.*, 2000). La sensibilidad de este método permite la detección de hasta 10 UFC/ml en material vegetal asintomático proveniente de plantas con tumores. Otras técnicas moleculares desarrolladas posteriormente, como la *nested-PCR*, también permite detectar a este patógeno en material asintomático de olivo (Bertolini *et al.*, 2003a). Además, se ha puesto a punto una *multiplex nested RT-PCR* que permite la detección simultánea, y en una sola reacción, de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* y de cuatro virus que afectan al olivo (Bertolini *et al.*, 2003b).

Recientemente se ha descrito que las cepas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* contienen dos alelos diferentes del gen *iaaL*, siendo la secuencia de uno de ellos, denominado alelo *iaaL*-Psn, 100% idéntica a la del gen ortólogo en la bacteria patógena de adelfa (*Nerium oleander*) *P. savastanoi* pv. *nerii*. La secuencia del otro alelo, denominado alelo *iaaL*-Psv, es 93% idéntica a la de su ortólogo (*iaaL*-Pto) en la bacteria patógena de tomate *P. syringae* pv. *syringae* DC3000. Además, se ha descrito que la secuencia del alelo *iaaL*-Psv de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* contiene un número variable de repeticiones en tándem del trinucleótido TAC (Matas *et al.*, 2009). Las repeticiones TAC se localizan dentro del fragmento interno de 454 pb utilizado por Penyalver y colaboradores (2000) para la identificación de esta bacteria patógena mediante PCR. Se ha determinado que el número de repeticiones TAC dentro de la secuencia del alelo *iaaL*-Psv de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* varía de una cepa a otra entre 3 y 15 veces. De entre las 30 cepas analizadas, el mayor número de repeticiones detectadas (entre 8 y 15) corresponden a cepas aisladas en la Península Ibérica (España y Portugal) (Matas *et al.*, 2009).

Las variaciones en la secuencia de nucleótidos del fragmento de 454 pb procedente de los alelos *iaaL*-Pto, *iaaL*-Psn e *iaaL*-Psv, permiten su diferenciación mediante PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilizando la enzima *HaeIII*. Para ello, la visualización de los productos de restricción debe llevarse a cabo en geles de agarosa al 3% (Matas *et al.*, 2009), en lugar de en gel de agarosa al 2%, tal y como indicaban Penyalver y colaboradores (2000).

El número de repeticiones TAC de los alelos *iaaL*-Pto, *iaaL*-Psn e *iaaL*-Psv puede determinarse mediante electroforesis capilar de fragmentos amplificados, que contengan las secuencias repetidas, a partir de estos alelos. Para ello, se han utilizando los oligonucleótidos IAAL-F (Penyalver *et al.*, 2000) e IAAL-6-FAM, este último, marcado con 6-carboxifluoresceína (6-FAM). Los productos de amplificación obtenidos con estos dos cebadores varían entre 122 pb y 158 pb, dependiendo del número de repeticiones TAC de cada alelo (Matas *et al.*, 2009). El número de repeticiones TAC de un determinado alelo *iaaL*, también puede determinarse separando los productos de amplificación de los alelos *iaaL* en gel desnaturante de acrilamida al 6%. Para la amplificación, se utiliza el cebador IAAL-F y otro cebador idéntico en secuencia a IAAL-6-FAM (IAAL-TAC-R) que no está marcado con 6-FAM (datos no publicados).

El número de repeticiones TAC del alelo *iaaL*-Psv de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, se mantiene de forma estable tras cultivar las cepas en medio de cultivo rico LB durante al menos 50 generaciones. El número de repeticiones TAC también se mantiene de forma estable dentro de los tumores desarrollados en plantas de olivo durante al menos un año. La estabilidad *in planta* se ha determinado tanto en gel de acrilamida al 6% (datos no publicados) como mediante electroforesis capilar (Matas *et al.*, 2009). La estabilidad demostrada de este marcador molecular, tanto *in vitro* como *in planta*, permitiría la utilización del mismo para la tipificación de cepas de este agente patógeno.

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores, procedimiento y kit para el diagnóstico y tipificación de bacterias patógenas del olivo, y más concretamente para el diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, agente causante de la tuberculosis del olivo. Entre las ventajas que dicha invención representa en relación con el estado de la técnica destacan: el uso de cebadores no fluorescentes, lo que evita la utilización de equipamiento especializado y de alto coste, así como más estables y eficaces; y la obtención de resultados más fácilmente analizables mediante electroforesis en gel y consecuentemente diagnósticos más específicos.

Descripción detallada de la invención

Constituye un primer objeto de la presente invención un conjunto de cebadores para el diagnóstico de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, en el cual al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2. Preferentemente, dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 2. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 1 y la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 2.

Constituye un segundo objeto de la presente invención un conjunto de cebadores para la tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, en el cual al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias

que comprenden a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 3. Preferentemente, dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 3. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 1 y la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 3.

Constituye un tercer objeto de la presente invención un procedimiento (A) para el diagnóstico de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* que comprende (a) la amplificación mediante PCR de una muestra de ADN usando el conjunto de cebadores para el diagnóstico de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* anteriormente referido, (b) la digestión mediante la enzima de restricción HaeIII de los productos resultantes de la reacción de PCR (a), y (c) el análisis de los fragmentos resultantes de la digestión (b) mediante electroforesis.

Constituye un cuarto objeto de la presente invención un procedimiento (B) para el diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* que comprende (a) la amplificación mediante PCR de una muestra de ADN usando el conjunto de cebadores para el diagnóstico de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* anteriormente referido, (b) la amplificación mediante PCR usando el conjunto de cebadores para la tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* anteriormente referido de una muestra de ADN previamente diagnosticada como *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* [preferentemente mediante el procedimiento (A)], y (c) el análisis de los productos resultantes de la amplificación mediante PCR (b) mediante electroforesis.

Constituye un quinto objeto de la presente invención un marcador de repeticiones TAC para la tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Este marcador permite la determinación del número de repeticiones TAC en cada uno de los alelos *iaaL* presentes en un aislado concreto y comprende una colección de fragmentos de ADN amplificados a partir de alelos *iaaL*-Psv con un número variable de repeticiones TAC.

Constituye un sexto objeto de la presente invención un kit para diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* que comprende al menos un conjunto de cebadores para el diagnóstico, y un conjunto de cebadores para la tipificación tal y como los anteriormente referidos. Preferentemente, el kit comprende tres cebadores con secuencias de nucleótidos idénticas a las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, y SEQ ID NO 3.

Constituye un séptimo objeto de la presente invención un kit para diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* que comprende, además de los conjuntos de cebadores anteriormente referidos, plásmidos control generados mediante la clonación en vectores plásmidos de fragmentos de ADN generados mediante PCR usando el conjunto de cebadores para el diagnóstico de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* anteriormente referido.

Descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática del número y longitud de los fragmentos generados tras la digestión con la enzima de restricción HaeIII de los productos de la amplificación por PCR de diferentes alelos del gen *iaaL* utilizando los cebadores IAAL-F1 (SEQ ID NO 1) e IAAL-R1 (SEQ ID NO 2). (A) *iaaL*-Psn (*P. savastanoi* pv. *nerii* EW2009); (B) *iaaL*-Pto (*P. syringae* pv. *tomato* DC3000); (C) y (D) *iaaL*-Psn e *iaaL*-Psv, respectivamente (*P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335). Las puntas de flecha indican los sitios HaeIII, y los números (pb) el tamaño de los fragmentos que se generan tras la digestión. La barra vertical indica el sitio de localización de las repeticiones TAC dentro del fragmento amplificado.

Modos de realización de la invención

A continuación se describe, sin carácter limitativo, un modo de realización preferente de la invención.

Cebadores IAAL-F1 (SEQ ID NO 1) e IAAL-R1 (SEQ ID NO 2)

Los cebadores IAAL-F1 (SEQ ID NO 1) e IAAL-R1 (SEQ ID NO 2) se han diseñado para ser utilizados en la amplificación mediante PCR de una muestra de ADN para el diagnóstico de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Sus secuencias hibridan fuera de la secuencia del fragmento de 454 pb descrito por Penyalver y colaboradores (2000) y utilizado en la reacción de PCR-RFLP descrita por Matas y colaboradores (2009). El diseño de estos cebadores ha sido posible gracias a la secuenciación completa de los alelos *iaaL*-Psv e *iaaL*-Psn de la cepa de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB3335.

La figura 1 muestra los sitios de hibridación de esta pareja de cebadores en la secuencia de nucleótidos de los alelos *iaaL*-Pto (*P. syringae* pv. *tomato* DC3000), *iaaL*-Psn (*P. savastanoi* pv. *nerii* EW2009), e *iaaL*-Psv (*P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB3335). Las secuencias completas de los alelos *iaaL*-Psn e *iaaL*-Psv de NCPPB 3335 no están disponibles en las bases de datos. La secuencia de estos dos oligonucleótidos y sus temperaturas de fusión (Tm) se indican en la Tabla 1.

TABLA 1

Secuencias y temperaturas de fusión (T_m) correspondientes a los cebadores IAAL-F1 (SEQ ID NO 1), IAAL-R1 (SEQ ID NO 2), e IAAL-R2 (SEQ ID NO 3)

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Temperatura de fusión (T _m)
IAAL-F1	GCGAAACTGCCTGATCGG	54 °C
IAAL-R1	GTCTCCCGCTGGATGTC	56 °C
IAAL-R2	TGCTGCGGAAGACGTTGG	54 °C

El cebador IAAL-R1 híbrida exactamente con regiones idénticas de la secuencia de nucleótidos de todos los alelos *iaaL* cuya secuencia es conocida. La secuencia del cebador IAAL-F1 híbrida con regiones idénticas de la secuencia de los alelos *iaaL* de todas las cepas de *P. savastanoi* y se diferencia en una única base (localizada en la cercanía del extremo 5' del oligonucleótido) con la secuencia del alelo *iaaL*-Pto. En comparación con la secuencia del cebador IAAL-F utilizado por Penyalver y colaboradores (2000), la secuencia de IAAL-F1 resulta más estable para la amplificación de todos los alelos, puesto que la secuencia de IAAL-F difiere en 1 base, localizada en la cercanía del extremo 3' del cebador, con la secuencia de los alelos *iaaL*-Psn de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* y pv. *nerii*.

A diferencia de los métodos de diagnóstico de la tuberculosis del olivo publicados anteriormente, la utilización de estos cebadores, posterior digestión de los productos obtenidos con *Hae*III y visualización de los fragmentos en gel de agarosa al 3%, permitiría diferenciar los dos alelos del gen *iaaL* presentes en *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, dando lugar a un diagnóstico del patógeno más específico que los métodos que no diferencian ambos alelos (Penyalver *et al.*, 2000; Bertolini *et al.*, 2003a; Bertolini *et al.*, 2003b). La utilización de estos cebadores tiene la ventaja, sobre los descritos anteriormente, que amplifican un fragmento del gen de mayor tamaño (659 pb en el caso de 3 repeticiones TAC), cuya digestión con *Hae*III daría lugar a fragmentos mayores que se visualizarían más fácilmente en gel de agarosa al 3% que los descritos por Matas y colaboradores (2009) (Figura 1).

Cebador IAAL-R2 (SEQ ID NO 3)

El cebador IAAL-R2 (SEQ ID NO 3) híbrida exactamente con la secuencia de todos los alelos *iaaL* cuya secuencia es conocida. La secuencia de este oligonucleótido y su temperatura de fusión (T_m) se indican en la Tabla 1. Este cebador ha sido diseñado para ser utilizado en combinación con IAAL-F1 (SEQ ID NO 1) en la amplificación mediante PCR de una muestra de ADN para la tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Tipificación de cepas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi*

Los fragmentos obtenidos tras la reacción de amplificación por PCR utilizando los cebadores para la tipificación IAAL-F1 (SEQ ID NO 1) e IAAL-R2 (SEQ ID NO 3), realizada a partir de muestras de ADN antes diagnosticadas mediante amplificación por PCR usando los cebadores IAAL-F1 (SEQ ID NO 1) e IAAL-R1 (SEQ ID NO 2), son analizados mediante electroforesis en gel de arcilamida al 6%. A diferencia del método publicado por Matas y colaboradores (2009), la utilización de cebadores no fluorescentes para la amplificación de fragmentos del gen *iaaL*, y posterior resolución de los fragmentos en gel de archilamida al 6%, evita la utilización de equipamiento especializado y de alto coste como secuenciadores capilares.

Plásmidos control

El kit para diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, que preferentemente comprende los cebadores IAAL-F1 (SEQ ID NO 1), IAAL-R1 (SEQ ID NO 2), e IAAL-R2 (SEQ ID NO 3), puede incluir, además, plásmidos control, procedentes de la clonación en un vector plasmídico de cada uno de los fragmentos de ADN generados mediante PCR con los cebadores IAAL-F1 (SEQ ID NO 1), IAAL-R1 (SEQ ID NO 2) a partir de los alelos *iaaL*-Pto (*P. syringae* pv. *tomato* DC3000), *iaaL*-Psn e *iaaL*-Psv (*P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335).

Estos plásmidos control se utilizan como molde en las amplificaciones, de igual forma que las muestras de ADN obtenidas de cultivos procedentes de aislados concretos de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* o de cultivos enriquecidos llevados a cabo a partir de olivo. Tras la digestión de los fragmentos amplificados (plásmidos control y muestras) con *Hae*III, los fragmentos se separan en gel de agarosa al 3%. La visualización de los fragmentos obtenidos a partir de las muestras, en comparación con los patrones producidos a partir de los plásmidos control, permite determinar de forma sencilla si la muestra problema corresponde al patógeno de olivo o a otra bacteria fitopatógena diferente pero que contenga el gen *iaaL* (por ejemplo, *P. syringae* pv. *tomato*).

Marcador de repeticiones TAC

TABLA 2

Número de repeticiones TAC que caracterizan distintas cepas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* y *P. syringae* pv. *tomato*

Cepa Bacteriana	(TAC)n
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	
DC3000	3
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	
NCPFB 3335	5
LSC C3.01	6
IVIA 1649-1	8
IVIA 16576-a2	9
IVIA 1637-B3	10
IVIA 1629-1a	12
IVIA 1637-C1	13
IVIA 1651-c15	14
IVIA 1657-b8	15

Preferentemente consiste en una colección de fragmentos obtenidos mediante la amplificación por PCR, utilizando como cebadores IAAL-F1 (SEQ ID NO 1) e IAAL-R2 (SEQ ID NO 3), de ADN genómico aislado de cepas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* y *P. syringae* pv. *tomato* para las cuales se ha determinado el número de TAC en sus correspondientes alelos *iaaL*. Dichos fragmentos difieren en tamaño al presentar un número variable de repeticiones TAC, en el rango de 3 a 15 repeticiones (Tabla 2).

Aplicación industrial

La presente invención permite, entre otros, (a) la certificación de olivos libres de patógeno, (b) el diagnóstico de olivos enfermos de tuberculosis, y (c) la tipificación molecular de cepas de esta bacteria, de gran utilidad para llevar a cabo estudios epidemiológicos de la tuberculosis del olivo.

Bibliografía

1. Bertolini, E., Olmos A., López M. M. & Cambra M. (2003a). Multiplex nested reverse transcription polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology* **93**:286-292.

2. Bertolini, E., Penyalver R., García A., Olmos A., Quesada J. M., Cambra M. & López M. M. (2003b). Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested PCR in a single closed tube. *Journal of Microbiological Methods* **52**:261-266.

3. BOE nº 276 (1999). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 22238, Real Decreto 1678/1999.

4. Comai, L., & Kosuge T. (1980). Involvement of plasmid deoxyribonucleic-acid in indoleacetic-acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology* **143**: 950-957.

5. Comai, L., & Kosuge T. (1982). Cloning and characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology* **149**: 40-46.

6. Cuesta, M. J. & Delgado A. (1995). Estudio y evaluación de las plagas y enfermedades del olivo *Olea europaea* en la cuenca del río Guadajoz. *Cuadernos de Fitopatología*: 144-150.

7. FAO. (2005). FAOSTAT Citation database results.

8. Gaffney T. D., da Costa e Silva O., Yamada T. & Kosuge T. (1990). Indolacetic acid operon of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*: transcription analysis and promoter identification. *Journal of Bacteriology* **172**: 5593-5601.

9. **Glass N. L. & Kosuge T.** (1986). Cloning of the gene for indoleacetic acid-lisine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Journal of Bacteriology* **166**:598-603.
- 5 **Hall, B. H., Cother, E. J., Whattam, M., Noble, D., Luck, J. & Cartwright D.** (2004). First report of olive knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australasian Plant Pathology* **33**: 433-436.
- 10 **Hutzinger O. & Kosuge T.** (1968) 3-indoleacetic-L-lysine, a new conjugate of 3-indoleacetic acid produced by *Pseudomonas savastanoi*. pp. 183-194 in *Biochemistry and Physiology of plant growth substances*, edited by Wightman F. & Setterfield G. The Runge Press, Ltd., Ottawa, Ontario.
11. **Iacobellis, N. S., Sisto A., Surico G., Evidente A. & Dimaio E.** (1994a). Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* mutants defective in phytohormone production. *Journal of Phytopathology* **140**: 238-248.
- 15 12. **Kosuge T., Heskett M. G. & Wilson E. E.** (1966) Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid. I. The conversion of L-tryptophan to indole-3-acetamide by an enzyme system from *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Biological Chemistry* **241**:3738-3744.
- 20 13. **Kuo T. T. & Kosuge T.** (1969). Factors influencing the production and further metabolism of indole-3-acetic acid by *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of General and Applied Microbiology* **16**: 191 -204.
14. **Magie, A. R.** (1963). Physiological factors involved in tumor production by the oleander knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi* pp. 104. *Ph. D. Thesis*. University of California.
- 25 15. **Matas I. M., Pérez-Martínez I., Quesada J. M., Rodríguez-Herva J. J., Penyalver R. & Ramos C.** (2009). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* contains two *iaaL* paralogs, one of which exhibits a variable number of a trinucleotide (TAC) tandem repeat. *Applied and Environmental Microbiology* **75** (4): 1030-1035.
- 30 16. **Macdonald, E. M. S., Powell G. K., Regier D. A., Glass N. L., Roberto F., Kosuge T. and Morris, R. O.** (1986). Secretion of Zeatin, Ribosylzeatin and Ribosyl-1²-Methylzeatin by *Pseudomonas savastanoi* - Plasmid-coded cytokinin biosynthesis. *Plant Physiology* **82**: 742-747.
17. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2007). Informe número 4.
- 35 18. **Penyalver R., García A., Ferrer A., Bertolini E. & López M. M.** (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* in olive plans by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2673-2677.
- 40 19. **Quesada J. M., Penyalver R., Salcedo C. I., Ruíz M. L. & López M. M.** (2004). Efecto de los tratamientos químicos sobre la dinámica de las poblaciones epidémicas de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, causante de la tuberculosis del olivo, y sobre la enfermedad. XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (Girona) p. 71.
- 45 20. **Quesada J. M., Penyalver R., Pérez-Panadés J., Salcedo C. I., Carbonell E. A., & López M. M.** (2009). Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. *Plant Pathology* **59**: 262-269.
- 50 21. **Smidt, M., & Kosuge T.** (1978). The role of indole-3-acetic acid accumulation by alphanmethyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation in oleander. *Physiological Plant Pathology* **13**: 203-214.
- 55 22. **Surico, G., A. Evidente, N. S. Iacobellis & Randazzo G.** (1985). A cytokinin from the culture filtrate of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Phytochemistry* **24**: 1499-1502.
23. **Taylor, R. K., Hale, C. N. & Hartill, W. F. T.** (2001). A stem canker disease of olive (*Olea europaea*) in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **29**: 219-228.
- 60 24. **Trapero, A. & Blanco, M. A.** (1996). Enfermedades: Tuberculosis. En: *El cultivo del olivo*, pp. 489-493, Barranco D., Fernández-Escobar D., and Rallo L. (eds.). Ediciones Mundi-Prensa (Madrid-Barcelona-México), Coedición Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca.

ES 2 370 617 A1

REIVINDICACIONES

5 1. Conjunto de cebadores para el diagnóstico de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* **caracterizado** porque al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias idénticas a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.

10 2. Conjunto de cebadores para el diagnóstico de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* según la reivindicación anterior **caracterizado** porque dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 2.

15 3. Conjunto de cebadores para la tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* **caracterizado** porque al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias idénticas a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 3.

20 4. Conjunto de cebadores para la tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* según la reivindicación anterior **caracterizado** porque dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 3.

25 5. Procedimiento para el diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* **caracterizado** porque comprende:

- 25 a. la amplificación mediante PCR de una muestra de ADN usando un conjunto de cebadores descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2,
- 30 b. la digestión mediante la enzima de restricción HaeIII de los productos resultantes de la reacción de PCR, y
- 30 c. el diagnóstico de la muestra de ADN amplificada mediante PCR (a) mediante análisis de los fragmentos resultantes de la digestión (b) mediante electroforesis.

35 6. Procedimiento para el diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la electroforesis se realiza en gel de agarosa al 3%.

40 7. Procedimiento para el diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* **caracterizado** porque comprende:

- 40 a. la amplificación mediante PCR de una muestra de ADN usando un conjunto de cebadores descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2,
- 45 b. la amplificación mediante PCR usando un conjunto de cebadores descrito según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 de una muestra de ADN previamente diagnosticada como *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, y
- 50 c. la tipificación de la muestra de ADN amplificada mediante PCR (b) mediante análisis de los productos resultantes mediante electroforesis.

50 8. Procedimiento para el diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la electroforesis se realiza en gel de acrilamida al 6%.

55 9. Procedimiento para el diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 **caracterizado** porque para la tipificación de la muestra de ADN, amplificada mediante PCR usando un conjunto de cebadores descrito según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, mediante análisis de los productos resultantes mediante electroforesis se emplea un marcador de repeticiones TAC que comprende una colección de fragmentos de ADN amplificados a partir de alelos *iaaL*-Psv con un número variable de repeticiones TAC.

60 10. Kit para el diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* que comprende al menos un conjunto de cebadores descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, y al menos un conjunto de cebadores descrito según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4.

65 11. Kit para el diagnóstico y tipificación de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* según la reivindicación anterior que comprende, además, plásmidos control generados mediante la clonación en vectores plásmidos de fragmentos de ADN generados mediante PCR usando el conjunto de cebadores para el diagnóstico de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.

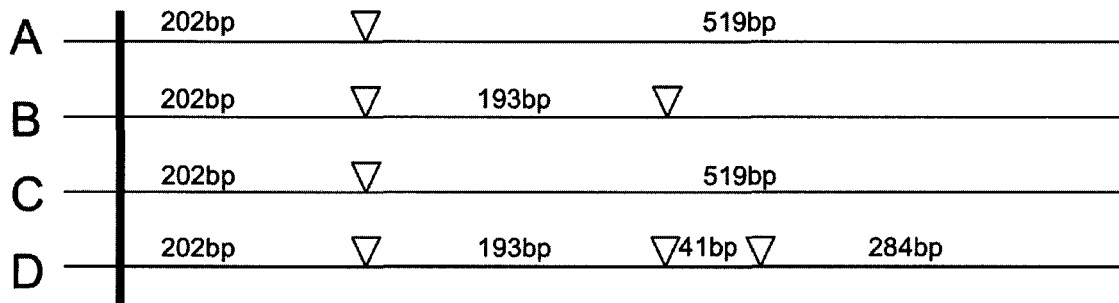


Figura 1

ES 2 370 617 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Málaga
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)
- 5
- <120> Conjunto de cebadores, procedimiento y kit para el diagnóstico y la tipificación de la bacteria patógena causante de la tuberculosis del olivo, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*
- 10 <130> I Matas *et al.*, 2010
- <160> 3
- 15 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
<211> 18
- 20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <223> Secuencia cebador directo IAAL-F1
- 25 <400> 1
- gcgaaactgc ctgatcgg 18
- 30 <210> 2
<211> 18
<212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <223> Secuencia cebador directo IAAL-R1
- 40 <400> 2
- gtcctcccgc tggatgctc 18
- 45 <210> 3
<211> 18
<212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 50 <223> Secuencia cebador directo IAAL-R2
- <400> 3
- 55 tgctgcggaa gacgttgg 18
- 60
- 65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201000535

②² Fecha de presentación de la solicitud: 21.04.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RODRIGUEZ-PALENZUELA, P., et al. Annotation and overview of the <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. Savastanoi NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. <i>Environmental Microbiology</i> . 01.04.2010. Vol. 12(6), páginas 1604-1620.	1-11
A	PENYALVER, R., et al. Detection of <i>Pseudomonas savastanoi</i> in olive plants by enrichment and PCR. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . 2000. Vol. 66(6), páginas 2673-2677.	1-11
A	MATAS I.M., et al. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. Savastanoi contains two <i>iaaL</i> paralogs, one of which exhibits a variable number of a trinucleotide (TAC) tandem repeat. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . 2009. Vol. 75(4), páginas 1030-1035.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.11.2011

Examinador
I. Rueda Molins

Página
1/4

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.11.2011

Declaración

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

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RODRIGUEZ-PALENZUELA, P., et al. Annotation and overview of the <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>Savastanoi</i> NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. <i>Environmental Microbiology</i> . Vol. 12(6), páginas 1604-1620.	01.04.2010
D02	PENYALVER, R., et al. Detection of <i>Pseudomonas savastanoi</i> in olive plants by enrichment and PCR. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . Vol. 66(6), páginas 2673-2677.	2000
D03	MATAS I.M., et al. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>Savastanoi</i> contains two <i>iaaL</i> paralogs, one of which exhibits a variable number of a trinucleotide (TAC) tandem repeat. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . Vol. 75(4), páginas 1030-1035.	2009

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

La solicitud de patente divulga un conjunto de cebadores, procedimiento y kit para el diagnóstico y la tipificación de la bacteria patógena causante de la tuberculosis del olivo, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

El documento D01 divulga, en la tabla 4 de la página 1615, genes identificados *in silico* correspondientes con los alelos *iaaL*-Psv y *iaaL*-Psn.

El documento D02 divulga cómo es posible detectar la presencia de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* mediante el empleo de PCR.

El documento D03 divulga un estudio de dos alelos diferentes del gen *iaaL*.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Arts. 6 y 8 LP11/1986)

Los cebadores reivindicados en la solicitud de patente (con las secuencias SEQ ID NO1, SEQ ID NO2 y SEQ ID NO3) no se han encontrado en el estado de la técnica. Por otro lado, a partir de la información divulgada en los documentos D01, D02 y D03 no resultaría evidente para un experto en la materia el desarrollo de los cebadores reivindicados en la solicitud de patente para el diagnóstico de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Por tanto, las reivindicaciones 1-11 presentan novedad y actividad inventiva en el sentido de los Artículos 6 y 8 LP11/1986.