

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 825**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2010 E 10774284 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2491136**

54 Título: **Ensayo para detección de Xanthomonas axonopodis pv. allii**

30 Prioridad:

21.10.2009 FR 0905053

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

24.06.2015

73 Titular/es:

**CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE
EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE
DEVELOPPEMENT (CIRAD) (100.0%)
42, rue Scheffer
75016 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**ROBENE, ISABELLE;
PRUVOST, OLIVIER y
LEGRAND, DELPHINE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 538 825 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

Ensayo para detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*

La presente invención se refiere a nuevas herramientas de detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*.

5 *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* es el agente causal del debilitamiento bacteriano de la cebolla, una de las principales limitaciones sanitarias del cultivo de las aliáceas. Esta enfermedad se observó por primera vez en 1971 en Barbados (Antillas), después, en 1975, en varias islas del archipiélago de Hawai. En la década de 1980 esta bacteria se encontró en Brasil, Cuba e isla Mauricio. De 1990 a 2000, llegó a Estados Unidos, Venezuela, Sudáfrica y Japón, provocando daños importantes. *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* se caracterizó por primera vez en Hawai en 1978 (Alvarez y col., *Physiopathology* ; 68 : 1132-1136, 1978).

10 *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* es patógeno de las aliáceas, en particular del ajo, puerro, cebolleta, chalota y cebolla (Roumagnac y col., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 15-24, 2004), tendiendo la enfermedad a ser más grave en la cebolla. Esta bacteria también se ha revelado como patógeno para especies del género *Citrus* durante infecciones experimentales por infiltración (Gent y col., *Phytopathology*, 95 (8): 918-925, 2005) ; por lo tanto, no hay ninguna prueba que muestre que esta bacteria es patógena en el campo para el género *Citrus*.

15 *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* provoca en la cebolla lesiones en los tejidos aéreos de la planta (hojas y tallos florales), caracterizadas por la presencia de pequeñas manchas acuosas lenticulares que se extienden y evolucionan rápidamente en clorosis y después necrosis. La enfermedad se ve favorecida por las temperaturas elevadas (superiores a 27 °C) y los principales focos aparecen rápidamente (de 7 a 10 días) después de un periodo de tiempo húmedo y lluvioso. A causa de la reducción del follaje, las plantas se atrofian y los bulbos disminuyen de tamaño, lo que da como resultado pérdidas de rendimiento importante, del orden de un 10 a un 50 %. Por ejemplo, en Estados Unidos, normalmente se observan pérdidas de rendimiento de un 20 %, o superior, en los campos infectados.

25 Se ha mostrado que la bacteria podía estar presente en las semillas de cebollas (Roumagnac y col., *Eur. J. Plant Pathol.*, 106: 867-877, 2000), que la enfermedad se podía difundir a gran escala, en particular por los intercambios comerciales de semillas, y que 4 semillas infectadas sobre 10000 era suficiente para desencadenar una epidemia (Roumagnac y col., *Phytopathology*, 94: 138-146, 2004).

30 Dentro de los cultivos, el viento y el riego, en particular el riego por aspersión, pueden asegurar una diseminación mayor de la enfermedad, como también es el caso con las tormentas y el granizo. Además, la bacteria es capaz de sobrevivir en los restos de los cultivos que a continuación se diseminan mediante la adhesión a la ropa y a los equipos de los trabajadores.

Debido a la importancia de las epidemias, y a la baja proporción de semillas contaminadas necesarias para desencadenar las consiguientes epidemias, esta bacteria se ha puesto en la lista de alerta de la Organización Europea de Protección de Plantas (OEPP) en 2006. Un procedimiento está en marcha para su inclusión en la lista A1 de organismos en cuarentena de la OEPP.

35 Están disponibles medidas de lucha contra el debilitamiento bacteriano de la cebolla, por ejemplo, uso de semillas sanas, destrucción de rebrotes de cebollas, destrucción de restos vegetales, rotaciones, control químico.

40 Además, las comercializaciones y los intercambios internacionales de semillas son los agentes principales de la propagación de esta enfermedad y representan un riesgo de introducción del agente patógeno en zonas sanas por la introducción de nuevos genotipos en zonas ya contaminadas. Por lo tanto, es necesario poder garantizar la buena calidad sanitaria de estas semillas. Para ello, son indispensables ensayos de diagnóstico de rutina rápidos, fiables y sensibles que permitan la certificación de los lotes de semillas de *Allium*. En la actualidad, no existen tales herramientas de diagnóstico. Los procedimientos de identificación usados en la actualidad se basan en el aislamiento de la bacteria a partir del material vegetal infectado y su puesta en cultivo sobre un medio apropiado, en particular el medio NCTM1 (Roumagnac y col., *Eur. J. Plant Pathol.*, 106: 867-877, 2000). El aislamiento de la bacteria necesita varios días, y la identidad de la bacteria se debe verificar de inmediato con procedimientos bioquímicos, tipificaciones moleculares y/o ensayos de patogenicidad (Gent y col., *Phytopathology*, 94 (2): 184-195, 2004; Picard y col., *Phytopathology*, 98 (9): 919-925, 2008). Además, la presencia de otras bacterias en las muestras puede disminuir en ciertos casos la sensibilidad del ensayo y provocar la detección de falsos positivos.

50 Se ha desarrollado un ensayo de identificación por amplificación con PCR de una secuencia específica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (Humeau y col., *Phytopathology*, 96 (12): 1345-1354, 2006; Picard y col., *Phytopathology*, 98 (9) : 919-925, 2008). Este ensayo consiste en realizar una PCR anidada usando, durante una primera etapa, los cebadores PXaa1U (SEC ID N°: 1) / PXaa1L (SEC ID N°: 2), después en una segunda etapa los cebadores NXaa1U (SEC ID N°: 3) / NXaa1L (SEC ID N°: 4). Sin embargo, aunque este procedimiento es sensible y fiable, no permite la detección de todas las cepas, en particular las que provienen de Barbados y de Brasil. La falta de detección de determinadas cepas se explicaría por la gran diversidad genética intrapopular de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (Picard y col., *Phytopathology*, 98 (9): 919-925, 2008; Gent y col., *Phytopathology*, 94 (2): 184-195, 2004; Gent y col., *Phytopathology*, 95 (8): 918-925, 2005). Además, un estudio de diversidad genética mostró

que el polimorfismo de las cepas era variable según su origen geográfico: existen zonas con una gran diversidad (en particular Estados Unidos, Sudáfrica) y zonas con una diversidad escasa (por ejemplo Venezuela, Hawai, Barbados).

En consecuencia, dado que en la actualidad no existe ningún ensayo disponible para detectar el conjunto de cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, es indispensable el desarrollo de una herramienta de diagnóstico fiable, sensible y que permita la detección de todas las cepas, independientemente de su origen geográfico, para optimizar la lucha contra las enfermedades provocadas por esta bacteria y para mejorar la vigilancia sanitaria durante los intercambios internacionales.

Los Inventores han identificado ahora dos secuencias de ADN diana específicas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. Estas secuencias diana, denominadas « PIL » y « AVR », se representan en el listado de secuencias adjunto con los números SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6, respectivamente.

El marcador PIL, puesto en evidencia por la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimorfo, o RAPD para « Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico », está presente en aproximadamente un 70 % de las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. Se ha comprobado que los cebadores PXaa1U (SEC ID N°: 1) / PXaa1L (SEC ID N°: 2) y NXaa1U (SEC ID N°: 3) / NXaa1L (SEC ID N°: 4) usados por Humeau y col. (Phytopathology, 96: 1345-1354, 2006) se hibridaban a esta secuencia diana.

El marcador « AVR », identificado por el procedimiento AFLP (para Polimorfismo de Longitud de Fragmento Amplificado), está al menos presente en todas las cepas que no poseen el marcador « PIL ».

Por lo tanto, debido a la complementariedad de estos marcadores, su búsqueda conjunta permite el diagnóstico selectivo del conjunto de cepas conocidas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*.

Por lo tanto, la presente invención tiene como objeto el uso de un polinucleótido aislado, para la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, este polinucleótido aislado, susceptible de obtención a partir de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, se define con la secuencia SEC ID N°: 6 y se elige entre el grupo constituido por:

- a) el polinucleótido de secuencia SEC ID N°: 6;
- b) un polinucleótido que tiene un 85 %, preferentemente un 90 %, y más preferentemente un 95 % de identidad con la secuencia SEC ID N°: 6;
- c) cualquier fragmento de al menos 15 pb de dicho polinucleótido;
- d) cualquier polinucleótido complementario de uno de los polinucleótidos a) o b);
- e) cualquier polinucleótido capaz de hibridarse selectivamente, en condiciones rigurosas con uno de los polinucleótidos a), b), c) o d).

Los porcentajes de identidad a los que se hace referencia como parte de la presentación de la presente invención se determina en una alineación global de las secuencias a comparar, usando el algoritmo de NEEDLEMAN y WUNSCH (J. Mol. Biol. 48, 443-453, 1970). Esta comparación de secuencia se puede realizar por ejemplo con la ayuda del software de alineación « Geneious » (Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A; 2009, Geneious v4.7).

El experto en la materia puede identificar condiciones rigurosas de hibridación, para un polinucleótido dado, en función del tamaño y la composición en bases del polinucleótido en cuestión, así como de la composición de la mezcla de hibridación (en particular el pH y la fuerza iónica). Por lo general, se obtienen condiciones rigurosas, para un polinucleótido de tamaño y secuencia dados, trabajando a una temperatura inferior de aproximadamente 5 °C a 10 °C a la temperatura de fusión (Tf) del híbrido formado, en la misma mezcla de reacción, por este polinucleótido y su complementario.

La presente invención engloba en particular polinucleótidos que se pueden usar como cebadores de amplificación para la obtención de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, o como sondas de ácido nucleico para la detección de dicha secuencia.

La presente invención engloba en particular los pares de cebadores que se pueden usar para la amplificación de un polinucleótido de secuencia SEC ID N°: 6, o un fragmento del mismo.

A modo de ejemplos no limitantes de pares de cebadores de acuerdo con la invención, se mencionarán en particular:

- el par de cebadores que consiste en los polinucleótidos PXaa2U (SEC ID N°: 7) y PXaa2L, (SEC ID N°: 8), que permite la amplificación de un fragmento de 995 pb de la secuencia SEC ID N°: 6 ;
- el par de cebadores que consiste en los polinucleótidos NXaa2U (SEC ID N°: 9) y NXaa2L, (SEC ID N°: 10), que permite la amplificación de un fragmento de 401 pb de la secuencia SEC ID N°: 6.

La Figura 1 representa la secuencia SEC ID N°: 6. Los fragmentos de secuencia en negrita delimitan los cebadores PXaa2U, PXaa2L, NXaa2U y NXaa2L.

Otro objeto de la presente invención es el uso de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención para el cribado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, y en particular las cepas que no comprenden el marcador « PIL ».

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de cribado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, caracterizado porque comprende:

- poner en presencia de ADN una muestra biológica susceptible de contener dicha bacteria con uno o varios polinucleótidos de acuerdo con la invención, en condiciones que permiten una hibridación selectiva entre dicho o dichos polinucleótidos y la secuencia diana SEC ID N°: 6, si ésta está presente en dicho ADN;
- detectar dicha hibridación.

La muestra biológica usada puede ser bien un cultivo de bacterias aisladas a partir de la planta o de las semillas de aliáceas en las que se desea realizar la detección, o bien directamente las semillas de aliáceas potencialmente infectadas, o una muestra de la planta potencialmente infectada. De forma ventajosa, la detección se realiza sobre semillas de cebolla.

La detección de la hibridación se puede realizar mediante todos los medios conocidos en sí mismo por los expertos en la materia. Cuando se usó un polinucleótido de acuerdo con la invención marcado previamente con la ayuda de un marcador apropiado, como sonda de ácido nucleico, la hibridación de la secuencia diana con la sonda marcada se detecta directamente.

Cuando se usaron dos polinucleótidos, que constituyen un par de cebadores de acuerdo con la invención, la hibridación de los cebadores con la secuencia diana se pone en evidencia por una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (amplificación de PCR para « reacción en cadena de la Polimerasa »), después por detección del producto de amplificación, en particular sobre gel de agarosa.

En este caso, el procedimiento de cribado de acuerdo con la invención comprende al menos las etapas siguientes:

- i) la puesta en presencia de ADN de una muestra biológica a someter a ensayo con un par de cebadores de acuerdo con la invención, en condiciones que permiten una hibridación selectiva entre los cebadores y la secuencia diana SEC ID N°: 6;
- ii) realizar una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa en condiciones que permiten la amplificación de la secuencia diana SEC ID N°: 6;
- iii) detectar el producto de amplificación.

De manera preferente, la detección se realiza por PCR « anidada » (o nested PCR). En este modo de realización de la invención, el procedimiento de cribado de acuerdo con la invención comprende además una segunda etapa de amplificación de PCR (etapa iv) realizada con la ayuda de un segundo par de cebadores que permiten amplificación de un fragmento interno del producto de amplificación de la primera etapa.

A modo de ejemplo, la primera etapa de amplificación (etapa ii) del procedimiento de acuerdo con este modo de realización se puede realizar usando el par de cebadores que consiste en los polinucleótidos PXaa2U (SEC ID N°: 7) y PXaa2L, (SEC ID N°: 8), y la segunda etapa de amplificación (etapa iv) usando el par de cebadores que consiste en los polinucleótidos NXaa2U (SEC ID N°: 9) y NXaa2L (SEC ID N°: 10).

Con el fin de poder detectar todas las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, es decir, las cepas que contienen los marcadores « PIL » y « AVR », y las que no contienen más que uno de estos dos marcadores, otro modo de realización particularmente ventajoso del presente procedimiento permite la detección de la secuencia diana SEC ID N° : 5 (marcado « PIL ») además del de la SEC ID N° : 6 (marcado « AVR »).

En este modo de realización en particular, se usa uno o varios polinucleótidos de acuerdo con la invención capaces de hibridarse selectivamente con la secuencia diana SEC ID N°: 6, y uno o varios polinucleótidos capaces de hibridarse selectivamente, en condiciones rigurosas, con la secuencia diana SEC ID N°: 5.

En el caso en el que procedimiento de detección de acuerdo con la invención comprende una etapa de amplificación de PCR, se usan pares de cebadores que permite la amplificación de un polinucleótido de secuencia SEC ID N°: 5, o un fragmento del mismo, y cebadores de acuerdo con la invención que permiten la amplificación de un polinucleótido de secuencia SEC ID N°: 6, o un fragmento del mismo.

En este caso, en la etapa i) del procedimiento de acuerdo con la invención, el ADN de la muestra se pone además en presencia de uno o varios polinucleótidos capaces de hibridarse selectivamente, en condiciones rigurosas, con la secuencia diana SEC ID N°: 5, y las condiciones de la etapa ii) que permiten, además de la amplificación de la secuencia diana SEC ID N°: 6, la amplificación de la secuencia diana SEC ID N°: 5.

Preferentemente, los pares de cebadores que se pueden usar para la amplificación del polinucleótido de secuencia SEC ID N°: 5 son:

- el par de cebadores PXaa1U (SEC ID N°: 1) y PXaa1L (SEC ID N°: 2), que permite la amplificación de un fragmento de 694 pb de la secuencia SEC ID N°: 5; y
- el par de cebadores NXaa1U (SEC ID N°: 3) y NXaa1L (SEC ID N°: 4), que permite la amplificación de un fragmento de 444 pb de la secuencia SEC ID N°: 5.

La Figura 2 representa la secuencia SEC ID N°: 5. Los fragmentos de secuencia en negrita delimitan los cebadores PXaa1U, PXaa1L, NXaa1U y NXaa1L.

5 Cuando se trata de un procedimiento de detección de acuerdo con la invención que comprende dos etapas de amplificación (modo de trabajo de « PCR anidada »), durante la primera etapa de amplificación (etapa ii) se usa un par de cebadores que permiten la amplificación de todo o parte del polinucleótido de secuencia SEC ID N°: 5, además del par de cebadores de acuerdo con la invención que permite la amplificación de todo o parte del polinucleótido de secuencia SEC ID N°: 6. En la segunda etapa de amplificación PCR (etapa iv), se usa un par de cebadores que permiten la amplificación de un fragmento interno del producto de amplificación de la secuencia SEC ID N° : 5 obtenido en la primera etapa, además de los cebadores de acuerdo con la invención que permiten amplificar un fragmento interno del producto de amplificación de la secuencia SEC ID N° : 6.

10 En un modo de realización particularmente ventajoso del procedimiento de acuerdo con la invención, la etapa de amplificación ii) se realiza con el par de cebadores PXaa1U (SEC ID N°: 1) y PXaa1L (SEC ID N°: 2) y el par de cebadores PXaa2U (SEC ID N°: 7) y PXaa2L (SEC ID N°: 8), la etapa de amplificación iv) se realiza con el par de cebadores NXaa1U (SEC ID N°: 3) y NXaa1L (SEC ID N°: 4) y el par de cebadores NXaa2U (SEC ID N°: 9) y NXaa2L (SEC ID N°: 10). Este modo de realización tiene un umbral de sensibilidad de aproximadamente 1 semilla contaminada sobre 27 300: por lo tanto, es particularmente fiable para evaluar el estado sanitario de una muestra de semillas, y se puede usar para la certificación de semillas de aliáceas dado que la tasa de contaminación de las semillas informado para las epidemias de debilitamiento bacteriano de la cebolla en medio tropical es de 4,5/10000.

20 Los modos de realización del procedimiento de acuerdo con la invención dirigidos a ambos genes diana « PIL » y « AVR » tienen la ventaja de poder detectar todas las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, como lo han demostrado los Inventores en una « colección mundial », que se enumera en la Tabla I (véase a continuación el Ejemplo 2.1), que consta de 87 cepas que provienen de diferentes regiones del mundo, mientras que la mayoría de las cepas de *Xanthomonas* diferentes del patovar *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* no se detectan. Solamente se detectan del mismo modo algunas cepas clasificadas en los subgrupos genéticos 9.1 y 9.2 de *Xanthomonas axonopodis*, no patógenos para la cebolla. Sin embargo, estas últimas se pueden distinguir fácilmente de las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* mediante un análisis del perfil de restricción, por ejemplo usando la enzima *NheI* que escinde únicamente el producto de amplificación de las cepas de *Xanthomonas euvesicatoria* (grupo 9.2), o usándola enzima *CfrI* que desciende únicamente el producto de amplificación del subgrupo 9.1 de *Xanthomonas axonopodis*, en particular *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*.

30 La presente invención quien igualmente por objeto un kit de detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* caracterizado porque comprende uno o varios polinucleótidos de acuerdo con la invención capaces de hibridarse selectivamente en condiciones rigurosas con la secuencia diana SEC ID N°: 6 y uno o varios polinucleótidos capaces de hibridarse selectivamente en condiciones rigurosas con la secuencia diana SEC ID N°: 5.

35 En el caso de la realización de un cribado por PCR anidada sobre los marcadores « PIL » y « AVR », el kit de detección de acuerdo con la invención comprende los pares de cebadores de amplificación siguientes:

- el par de cebadores constituido por los polinucleótidos PXaa1U (SEC ID N° : 1) y PXaa1L (SEC ID N° : 2) ;
- el par de cebadores constituido por los polinucleótidos NXaa1U (SEC ID N° : 3) y NXaa1L (SEC ID N° : 4) ;
- el par de cebadores constituido por los polinucleótidos PXaa2U (SEC ID N° : 7) y PXaa2L (SEC ID N° : 8) ; y
- el par de cebadores constituido por los polinucleótidos NXaa2U (SEC ID N°: 9) y NXaa2L (SEC ID N°: 10).

40 La presente invención se entenderá mejor con la ayuda del complemento de descripción que sigue a continuación, que se refiere a ejemplos no limitantes que ilustran la realización de la presente invención para la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*.

Ejemplo 1: Identificación de los marcadores « PIL » y « AVR ».

1.1. Identificación del marcador « PIL »

45 Las cepas usadas en el presente estudio se cultivaron en medio YPGA (7 g.l⁻¹ de extracto de levadura, 7 g.l⁻¹ de peptona, 7 g.l⁻¹ de glucosa, 18 g.l⁻¹ de agar, pH 7,2) o en medio de Wilbrink modificado (10 g.l⁻¹ de sacarosa, 5 g.l⁻¹ de bacto-peptona, 5 g.l⁻¹ de extracto de levadura, 0,5 g.l⁻¹ de K₂HPO₄, 0,25 g.l⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 0,05 g.l⁻¹ de Na₂SO₃, 15 g.l⁻¹ de agar, pH 6,9-7 ; Rott y col., Agron. Trop. ; 43: 244-251, 1988) para las cepas que presentan un crecimiento débil en el medio de YPGA.

50 La amplificación aleatoria del ADN polimorfo, o RAPD, se realizó a continuación. Para realizar esto, el ADN total de veintidós cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* que provienen de diversas zonas geográficas (véase a continuación, en la Tabla I, las cepas marcadas con « ^b ») y se extrajeron otras seis *Xanthomonas* (véase a continuación, en la Tabla II, las cepas marcadas con « ^d ») a partir de 2 ml de cultivo bacteriano usando el kit « DNeasy sangre y tejido » (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

55 Una amplificación de PCR se realizó sobre los extractos de ADN tomados de cada cepa. El medio de reacción de 25 µl contiene 25 ng de ADN genómico bacteriano, 3 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cebadores, 2,5 unidades de ADN

polimerasa Taq (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica), 100 µM de cada uno de los dNTP (Roche Diagnostics, Meylan, Francia) en medio tris-HCl 20 mM y 50 mM de tampón de KCl (pH 8,4). Se sometió a ensayo centenar de cebadores cortos de 10 nucleótidos de secuencia definida arbitrariamente que provienen de los kits de GC al 80, al 70 y al 60 % (Genome Express, Meylan, Francia).

5 La amplificación se realizó en las condiciones siguientes:

- desnaturalización inicial a 94 °C durante 7 min,
- 40 ciclos de amplificación comprendiendo cada uno 3 fases: 94 °C durante 1 min (desnaturalización), 35 °C durante 1 min (hibridación de los cebadores en el ADN) y 72 °C durante 2 min (polimerización),
- extensión a 72 °C durante 5 min.

10 Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa NuSieve al 2 % y se visualizaron por fluorescencia después de coloración con bromuro de etidio.

Resultó que ninguno de los fragmentos estaba presente en el conjunto de las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* sometidas a ensayo y ausente de otros patovares. Entre los fragmentos amplificados encontrados en la mayoría de las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* y ausentes de otras cepas, el fragmento amplificado con el cebador denominado 80-21 (SEC ID N°: 11 ; 5'ACGCGCCAGG 3'), de aproximadamente 940 pb, está presente en un 70 % de las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* sometidas a ensayo.

15 Este fragmento de interés se escindió del gel de agarosa por las cepas *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* CFBP6364, CFBP6366, CFBP6369 y CFBP6379, se extrajo usando el kit de extracción « Extracción en gel QIAquick » (Qiagen, Courtaboeuf, Francia), después se clonó por ligación en el vector pGEM-T Easy de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Promega, Madison, USA). La secuencia se determinó a continuación por secuenciación usando los cebadores T7 y SP6 que se vivirán en las regiones que bordean el inserto clonado en el vector pGEM-T Easy. Este fragmento es idéntico en un 99 % entre estas cuatro cepas, y una búsqueda en la base de datos GenBank desvela que comparte un 97 % de identidad con dos porciones contiguas (de 828 y 102 pb respectivamente) que pertenecen a los genes PILW y PILX de *Xanthomonas euvesicatoria*, genes que codifican para proteínas de ensamblaje del pilus.

20 Se debe indicar que ninguno de los otros fragmentos identificados por RAPD estaba presente en las cepas cuyo genoma no se amplificaba con el cebador 80-21.

1.2. Identificación del marcador « AVR »

30 Las cepas CFBP6369, CFBP6380, CFBP6384, JX36-1, CFBP6386 y CFBP6382 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, representativas de cepas no amplificadas por el cebador 80-21 se analizaron con la técnica de AFLP. Como control se usó una cepa de *Xanthomonas citri* pv. *citri* (IAPAR 306) y de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (CFBP 5251).

El análisis de AFLP se realizó tal como se describe en Ah-You y col. (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 306-318, 2009).

35 El ADN bacteriano, extraído como sea indicado anteriormente, se digirió en conjunto con *SacI* y *MspI*, a continuación se realizó la ligación con los adaptadores *SacI* y *MspI* durante 3 horas a 37 °C añadiendo 2,5 µl de producto de digestión a 22,5 µl de una mezcla de ligación que contiene 2 µM del adaptador *MspI*, 0,2 µM del adaptador *SacI* (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia) y 2 unidades de ADN ligasa T4 (New England Biolabs Ozyme) en un tampón de ligación 1X. Una amplificación previa de PCR se realiza en 15 µl de mezcla de reacción formada por 5 µl de mezcla de ligación diluida a una décima parte, 2,5 mM de MgCl₂, 0,23 µM de cada uno de los cebadores PSAC (SEC ID N°: 12) y PMSP (SEC ID N°: 13), 0,45 µM de cada dNTP, 0,5 unidades de ADN polimerasa Taq (Goldstar Red, Eurogentec, Seraing, Bélgica) en un tampón 1X Goldstar. La amplificación se produjo en las condiciones siguientes:

- extensión inicial a 72 °C durante 2 min,
- 45 - desnaturalización inicial a 92 °C durante 2 min,
- 25 ciclos de amplificación comprendiendo cada uno 3 fases: 94 °C durante 30 seg (desnaturalización), 56 °C durante 30 seg (hibridación de los cebadores en el ADN) y 72 °C durante 2 min (polimerización),
- extensión a 72 °C durante 10 min.

50 Los productos de amplificación se diluyen a continuación 10 veces en agua para HPLC antes de la amplificación selectiva. La amplificación selectiva se realiza con ayuda de los pares de cebadores no marcados *MspI* (SEC ID N°: 14) + A, T, G o C y *SacI* + C (SEC ID N°: 15), o *MspI* (SEC ID N°: 14) + A, T, G o C et *SacI* + CT (SEC ID N°: 16). Las condiciones de amplificación son las mismas que las que se han descrito para la amplificación previa, a excepción de la concentración de los cebadores *SacI* + C y *SacI* + CT que es de 0,12 µM.

55 Los productos de amplificación se analizaron a continuación sobre gel de acrilamida al 5 % (Risterucci y col., Theor. Appl. Genet.; 101 : 948-955, 2000) a continuación el ADN se visualizó por coloración con plata (Qu y col.,

Electrophoresis; 26: 99-101, 2005). Debido a la complejidad de los perfiles de AFLP obtenidos usando dos bases selectivas en la etapa de amplificación, solamente se aprovecharon los perfiles obtenidos con tres bases selectivas para recuperar los fragmentos de interés.

5 Se visualizaron dos fragmentos presentes en la mayoría de las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, cuyas cepas no se amplifican con el cebador 80-21.

10 Con el fin de identificar estos fragmentos, el ADN se extrajo del gel de acrilamida en 50 µl de tampón. A continuación, 5 µl se sometieron a una amplificación selectiva, como se describe en Ah-You y col. (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 306-318, 2009), usando los pares de cebadores *MspI* (SEC ID N°: 14) + A o T y *SacI* + CT (SEC ID N°: 16). Las condiciones de amplificación son las mismas que las que se han descrito para la amplificación previa, a excepción de la concentración del cebador *SacI* + CT que es de 0,12 µM.

15 Los fragmentos amplificados se introducen a continuación por ligación en el vector pGEM-T Easy como se ha descrito anteriormente, a continuación bacterias de *E. coli* se transformaron con los vectores que contienen los insertos. A pesar de las condiciones más rigurosas de amplificación con tres bases selectivas, la secuenciación de los clones obtenidos desveló que los ADN tenían una composición heterogénea, lo que se explica sin duda por una comigración de productos de amplificación de tamaño similar o una contaminación durante la etapa de escisión. Sin embargo, usando la amplificación con tres nucleótidos selectivos, se obtuvo un clon interesante a partir de fragmentos de AFLP que provienen de la cepa CFBP 6382. La secuenciación del inserto de este clon seguido de una búsqueda en la base de datos GenBank desveló la presencia de una secuencia de 270 pb que tenía un 90 % de identidad con una porción del gen de avirulencia *avrRxv* de *Xanthomonas euvesicatoria* (número de acceso en GenBank L20423). A partir de esta secuencia, los cebadores F1154 (SEC ID N°: 17) y R1391 (SEC ID N°: 18) se generaron después de realizar una PCR con la ayuda de estos cebadores en las cepas CFBP6366, CFBP6380, CFBP6384, JX36-1, CFBP 6386, CFBP6357 y CFBP6382.

20 La amplificación de PCR se realizó en 25 µl de mezcla de reacción formada por 20 ng de ADN total, 3 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cebadores, 1,25 unidades de polimerasa Dap Goldstar (Eurogentec, Seraing, Bélgica), 100 µM de cada uno de los dNTP (Roche Diagnostics, Meylan, Francia). Se usaron las siguientes condiciones de amplificación:

- extensión inicial a 72 °C durante 2 min,
- desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min,
- 40 ciclos de amplificación comprendiendo cada uno 3 fases: 95 °C durante 1 min (desnaturalización), 60 °C durante 1 min (hibridación de los cebadores en el ADN) y 72 °C durante 2 min (polimerización),
- 30 - extensión a 72 °C durante 5 min.

35 Se obtuvo un amplicón de 238 pb para cada una de las cepas sometidas a ensayo: a lo largo de las cepas, el fragmento de 238 pb compartía de un 90 para un 99 % del gen de avirulencia *avrRxv* de *Xanthomonas euvesicatoria* (número de referencia en GenBank L20423). Con el fin de obtener fragmentos de ADN más grandes para diseñar cebadores de PCR específicos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, se realizaron amplificaciones usando dos pares de cebadores F202 (SEC ID N°: 19), que corresponden a los nucleótidos 202-219 del gen de avirulencia *avrRxv* de *Xanthomonas euvesicatoria* (número de referencia en GenBank L20423) y R1391 (SEC ID N° : 18) elegido en el amplicón de 238 pb, así como los pares de cebadores F1154 (SEC ID N° : 17) y R2149 que corresponden a los nucleótidos 2131-2149 (SEC ID N° : 20) del gen de avirulencia *avrRxv* de *Xanthomonas euvesicatoria* (número de referencia en GenBank L20423). Un fragmento de 1948 pb se amplificó para las cepas CFBP6366, CFBP6386, CFBP6357 y CFBP6382, un fragmento de 1950 pb para las cepas CFBP 6384 et JX36-1 y una secuencia parcial de 1504 pb para la cepa CFBP 6380. Todas estas secuencias presentan entre un 87 y un 98 % de identidad con el gen *avrRxv* de *Xanthomonas euvesicatoria*.

Ejemplo 2: Detección específica de *Xanthomonas Axonopodis* pv. *Allii*.

2.1. Especificidad de la detección por PCR anidada multiplexada

45 A partir de los marcadores « PIL » (SEC ID N°: 5) y « AVR » (SEC ID N°: 6), se diseñaron pares de cebadores seleccionando las regiones más conservadas de estos dos marcadores entre las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*.

Para el marcador « PIL », los dos pares de cebadores elegidos son el par de cebadores PXaa1U (SEC ID N°: 1) y PXaa1L (SEC ID N°: 2) y el par de cebadores NXaa1U (SEC ID N°: 3) y NXaa1L, (SEC ID N°: 4).

50 Para el marcador « AVR », los dos pares de cebadores elegidos son el par de cebadores PXaa2U (SEC ID N°: 7) y PXaa2L (SEC ID N°: 8), y el par de cebadores NXaa2U (SEC ID N°: 9) y NXaa2L (SEC ID N°: 10).

55 Un análisis por PCR anidada multiplexada se realizó a continuación con la ayuda de estos cuatro pares de cebadores sobre 87 cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (véase la Tabla I que sigue a continuación), 101 cepas bacterianas fitopatógenas (otros patógenos y especies de *Xanthomonas*, otros géneros bacterianos), y 18 bacterias saprofitas de la cebolla (véase la Tabla II que sigue a continuación).

Se sometieron a ensayo diferentes tipos de muestras, en particular el ADN genómico bacteriano purificado, de suspensiones bacterianas y de semillas mezcladas con una cepa bacteriana.

5 La primera etapa del análisis por PCR anidada multiplexada se realizó en una mezcla de reacción de 25 µl constituida por 0,5 a 5 µl de muestra a someter a ensayo (según el tipo de muestra), 3 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada uno de los cebadores que constituyen los pares de cebadores PXaa2U (SEC ID N°: 7) / PXaa2L (SEC ID N°: 8) y PXaa1U (SEC ID N°: 1) / PXaa1L (SEC ID N°: 2), 100 µM de cada dNTP, 1,25 unidades de ADN polimerasa Taq (Goldstar Red, Eurogentec, Seraing, Bélgica), en un tampón de tris-HCl 75 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM y Tween 20 al 0,01 % (pH 8,8).

Las condiciones de amplificación usadas fueron las siguientes:

- 10
- desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min,
 - 40 ciclos de amplificación comprendiendo cada uno 3 fases: 95 °C durante 1 min (desnaturalización), 63 °C durante 1 min (hibridación de los cebadores en el ADN) y 72 °C durante 2 min (polimerización),
 - extensión a 72 °C durante 5 min.

15 La segunda etapa de la PCR anidada multiplexada se realizó con 1 a 5 µl de los amplicones obtenidos en la primera etapa de amplificación en condiciones análogas a las que se han descrito para la primera etapa de amplificación, a excepción de los pares de cebadores son los siguientes : se usaron NXaa2U (SEC ID N°: 9) / NXaa2L (SEC ID N°: 10) y NXaa1U (SEC ID N°: 3) / NXaa1L (SEC ID N°: 4). El programa de amplificación fue el siguiente:

- 20
- desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min,
 - 30 ciclos de amplificación comprendiendo cada uno 3 fases: 94 °C durante 30 seg (desnaturalización), 57 °C durante 30 seg (hibridación de los cebadores en el ADN) y 72 °C durante 40 seg (polimerización),
 - extensión a 72 °C durante 5 min.

Los productos de amplificación se analizaron a continuación sobre gel de agarosa al 1 % (amplicón que proviene de la primera etapa de amplificación) o al 3 % (amplicón que proviene de la segunda etapa de amplificación).

25 Entre las 87 cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* sometidas a ensayo, se obtienen tres tipos de resultados durante la primera etapa de amplificación:

- 30
- i) dos amplicones que tienen dos tamaños esperados, 694 pb (una porción del marcador « PIL ») y 995 pb (una porción del marcador « AVR ») se amplifican a partir de todas las cepas de Brasil, Cuba, Japón, isla Mauricio, isla de la Reunión y Hawai.
 - ii) un solo amplicón de 694 pb (una porción del marcador « PIL ») se amplificó a partir de todas las cepas que provienen de Georgia Venezolana, cuatro cepas de Colorado y dos cepas que provienen de Sudáfrica.
 - iii) un solo amplicón de 995 pb (una porción del marcador « AVR ») se amplificó a partir de todas las cepas que provienen de Barbados, Texas, tres cepas que provienen de Sudáfrica y una que proviene de Colorado.

35 Durante la segunda etapa de amplificación, se observaron los fragmentos siguientes, resultantes de la amplificación interna de los productos de amplificación de la primera etapa: se obtuvieron dos fragmentos de 444 pb (una porción interna del amplicón « PIL ») y 401 pb (una porción interna del amplicón « AVR ») para el grupo que presenta el perfil i), un único amplicón de 444 y 401 pb para los grupos ii) y iii) respectivamente.

Los resultados obtenidos para las 87 cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* sometidas a ensayo se resumen en la Tabla I que sigue a continuación.

40 Además, la patogenicidad de estas 87 cepas se confirmó por verificación de los postulados de Koch usando, para cada cepa, la especie anfitriona de la que proviene.

TABLA I

Cepas ^a	origen	Anfitrión	Respuesta a la PCR anidada Multiplexada ^f	
			amplicones de 694 pb/ 444 pb (marcador PIL)	amplicones de 995 pb/ 401 pb (marcador AVR)
CFBP 6384 ^{den} , JX36-1 ^{dent} , CFBP 6386 ^{dent}	Sudáfrica	<i>A. cepa</i> L	- / -	+ / +
CFBP 6385 ^{og} . JX36-2 ^l	Sudáfrica	<i>A. cepa</i> L	+ / +	- / -

(continuación)

Cepas ^a	origen	Anfitrión	Respuesta a la PCR anidada Multiplexada ^f	
			amplicones de 694 pb/ 444 pb (marcador PIL)	amplicones de 995 pb/ 401 pb (marcador AVR)
CFBP 6367 ^{bn} , JR512 ^l , JR513 ^{nl} , JR514, JR515, CFBP 6368 ^{hi}	Barbados	<i>A. cepa</i> L	- / -	+ / +
CFBP 6362 ^{ogn} , CFBP 6363 ^{gn} , JV593 ^{gn} , CFBP 6377 ^{ghj}	Brasil	<i>A. cepa</i> L	+ / +	+ / +
CFBP 6378 ^b	Brasil	<i>A. cepa</i> L	- / -	+ / +
CFBP 6364 ^{bogh} , CFBP 6365 ^{gn}	Cuba	<i>A. sativum</i> L	+ / +	+ / +
CFBP 6107 ^{ogn} , CFBP 6108 ^{ognj}	Japón	<i>A. fistulosum</i> L	+ / +	+ / +
JR649, JR650, JR651, CFBP 6374 ^{gn} , JR653, JR654-1, CFBP 6374, JR653, JR654-1, JR655, CFBP 6376 ^{bgh} , JS959, JS960, JS961, JS962	Mauricio	<i>A. cepa</i> L	+ / +	+ / +
JQ740-1, LMG 16528 ^{ognj} , CFBP 6366 ^{bcegnj} , CFBP 6369 ^{bodghj} , CFBP 6357 ^{egh} , JQ759, JR520-1, JR523-1, CFBP 6371 ^{gh} , CFBP 6372, CFBP 6373, CFBP 6375	Isla de Reunión	<i>A. cepa</i> L	+ / +	+ / +
CFBP 6355 ^{gn} , LA261-18, JX366-2	Isla de Reunión	<i>A. sativum</i> L	+ / +	+ / +
JX-373-2, LB239-18	Isla de Reunión	<i>A. porrum</i> L	+ / +	+ / +
JY317 ^{gj} , CFBP 6379 ^{dcg} , JY319 ^g , JY320 ^g	Colorado (USA)		+ / +	- / -
CFBP 6380 ^{bdehi}	Colorado (USA)	<i>A. cepa</i> L	- / -	+ / +
JY274, JY275, JY276 ^{bgj}	Georgia (USA)		+ / +	- / -
LMG 577, LMG 578, LMG 579 ^l , CFBP 6359 ^{bgh} , LMG 943, LMG 9487, LMG 9488, LMG 9489, CFBP 6360 ^{gh} , LMG 9491, LMG 9492, CFBP 6361 ^{bgh} , LMG 9494	Hawai (USA)	<i>A. cepa</i> L	+ / +	+ / +
JW200, CFBP 6381 ^{bhi} , JW202, CFBP 6382 ^{bde} , JW204, JW205, CFBP 6383 ^{hi}	Texas (USA)	<i>A. cepa</i> L	- / -	+ / +
CFBP 6387 ^{og} , JX722 ^l , JX724, JX725, JX726, CFBP 6338 ^{bg} , JX728	Venezuela	<i>A. cepa</i> L	+ / +	- / -

^aCFBP. Colección Francesa de Bacterias Fitopatógenas, Estación de Patología Vegetal, Angers, Francia. BCCMTM/LMG, Colección de bacterias, Laboratorio de Microbiología, Universidad de Gante, Bélgica: Las otras cepas pertenecen a nuestra colección de laboratorio (3P, Reunión. Francia).
 Todas las cepas enumeradas en esta tabla son patógenos de la cebolla.
^b Cepas usadas para evaluar los marcadores RAPD (22 cepas).
^c Cepas para las que se ha clonado y secuenciado el marcador RAD 80-21 (4 cepas).
^d Cepas usadas para evaluar los marcadores AFLP (6 cepas).
^e Cepas para las que se ha clonado y secuenciado el fragmento AFLP de 238 pb (7 cepas)
^f +. fragmento de tamaño esperado amplificado: -, sin amplicón detectable.
^g Cepas para las que se ha amplificado y se ha secuenciado el ADN con los cebadores PXaa1U y PXaa1L (27 cepas).

(continuación)

Cepas ^a	origen	Anfitrión	Respuesta a la PCR anidada Multiplexada ^f	
			amplicones de 694 pb/ 444 pb (marcador PIL)	amplicones de 995 pb/ 401 pb (marcador AVR)
^h Cepas para las que el ADN se ha amplificado y se ha secuenciado con los cebadores PXaa2U y PXaa2L (28 cepas). ⁱ Cepas usadas para el análisis de restricción con CfrI (8 cepas). ^j Cepas usadas para el análisis de restricción con NheI (10 cepas) * Patotipo de Cepa				

5 Un ejemplo de resultado de PCR anidada multiplexada se ilustra en la Figura 3. La pista 11 representa el control de PCR negativo, las pistas 1 la 10 representan los resultados obtenidos para las cepas CFBP 6384, CFBP 6385, CFBP 6380, CFBP 6379, CFBP 6369, CFBP 6107, JY 276, CFBP 6387, CFBP 6368 y CFBP 6381. La pista M corresponde a los marcadores de tamaño molecular.

10 Cuando los ensayos de PCR anidada multiplexada realizados en las cepas saprofitas de la cebolla y en cepas que pertenecen a otros géneros bacterianos, no se observó producto de amplificación alguno. Del mismo modo, la mayoría de las cepas de *Xanthomonas* no se amplifican por PCR anidada multiplexada. Sin embargo, resultó que algunas cepas de *Xanthomonas axonopodis* clasificadas en el subgrupo genético 9.2 en el sentido de Rademaker se detectaban igualmente. En función del patovar, destacaron los amplicones del marcador « PIL » y/o los del marcador « AVR ». Además, los amplicones del marcador « AVR » se detectan igualmente con las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* (subgrupo genético 9.1 en el sentido de Rademaker).

15 Los resultados obtenidos con las cepas saprofitas de la cebolla y las cepas que pertenecen a otros géneros bacterianos sometidos a ensayo se resumen en la Tabla II que sigue a continuación.

TABLA II

Cepas ^a	Taxón	Respuesta a la PCR anidada Multiplexada ^c	
		amplicones de 694 pb/ 444 pb (marcador PIL)	amplicones de 995 pb/ 401 pb (marcador AVR)
Subgrupo genético 9.2 LMG 667 ^{bdeh} , LMG 668 ^{efh} , LMG 905 ^h , LMG 909, LMG 910 ^{efh} , LMG 913 ^{beh} , LMG 914 ^h , LMG 922 ^{efh} , LMG 926 ^e , LMG927 ^e , LMG 929 ^{eth} , LMG 930 ^{ef} , LMG 931 ^{eth} , LMG 932 ^{efh} , LMG 933 ^{efh} , CFBP 5600 ^{*eth}	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	+ / +	+ / +
JJ238-20, JJ238-26, JJ238-27, JJ238-28	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>citrumelo</i>	- / -	- / -
CFBP 2910 ^{Dr}	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>	- / -	+ / +
LMG 497 ^{Dr} , LMG 8019	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>alfalfae</i>	- / -	- / -
LMG 675 ^{Dr}	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>cassiae</i>	- / -	- / -
LMG 8048 ^{De}	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>cassavae</i>	+ / +	- / -

(continuación)

Cepas ^a	Taxón	Respuesta a la PCR anidada Multiplexada ^c	
		amplicones de 694 pb/ 444 pb (marcador PIL)	amplicones de 995 pb/ 401 pb (marcador AVR)
LMG 861 ^{dt}	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>ricini</i>	- / -	- / -
LMG 686 [*]	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>coracanae</i>	- / -	- / -
LMG 691 ^ˆ	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>cyamopsidis</i>	- / -	- / -
LMG 692 ^{dt}	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>desmodii</i>	- / -	+ / +
LMG 693 ^{bet}	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>desmodiigangetici</i>	+ / +	- / -
LMG 694 ^ˆ	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>desmodiironmdifolii</i>	- / -	- / -
LMG 698 ^ˆ	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>erythrinae</i>	- / -	- / -
LMG 811 ^ˆ	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>patelii</i>	- / -	- / -
LMG 844 ^{bet}	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phyllanthi</i>	+ / +	+ / +
LMG 819 ^ˆ	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>poinsettiicola</i>	- / -	- / -
LMG 955 ^e	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>tamarindi</i>	+ / +	- / -
NCPFB 938 ^{bet}	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>lespedezae</i>	+ / +	+ / +
Subgrupo genético 9.1 LMG 551 ^{bfg} , LMG 7303 ^{bfg} , CFBP 2524 ^{bfg}	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	+ / +	+ / +
Subgrupo genético 9.3 LMG 982 ^ˆ , LMG 539	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	- / -	- / -

(continuación)

Cepas ^a	Taxón	Respuesta a la PCR anidada Multiplexada ^c	
		amplicones de 694 pb/ 444 pb (marcador PIL)	amplicones de 995 pb/ 401 pb (marcador AVR)
LMG 901 [†] , LMG 8285	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	- / -	- / -
Subgrupo genético 9.4 LMG 8014. JR518-3	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	- / -	- / -
CFBP 2603	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	- / -	- / -
LMG 695 ^{d†}	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	- / -	- / -
Subgrupo genético 9.5 C 39, JA159-1, CFBP 2525 ^{d†} , LAPAR 306	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	- / -	- / -
LMG 548 [†]	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>bauhiniae</i>	- / -	- / -
LMG 558 [†]	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>cajani</i>	- / -	- / -
CFBP 1716 [†] , CFBP 2933	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	- / -	- / -
LMG 761 [†] , LMG 7429	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	- / -	- / -
Subgrupo genético 9.6 LMG 7387	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>cajani</i>	- / -	- / -
LMG 8752 [†]	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vignicola</i>	- / -	- / -
Otras especies LMG 733. CFBP 4925 [†]	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>hederae</i>	- / -	- / -
LMG 904, LMG 915, LMG 911 ^T	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	- / -	- / -
CFBP 1156 ^T	<i>Xanthomonas hyacinthi</i>	- / -	- / -
CFBP 1976 ^T	<i>Xanthomonas bromi</i>	- / -	- / -

(continuación)

Cepas ^a	Taxón	Respuesta a la PCR anidada Multiplexada ^c	
		amplicones de 694 pb/ 444 pb (marcador PIL)	amplicones de 995 pb/ 401 pb (marcador AVR)
LMG 710, CFBP 2157 [†]	<i>Xanthomonas fragariae</i>	- / -	- / -
CFBP 5251 [†]	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
CFBP 2528 [†]	<i>Xanthomonas arboricoia</i> pv. <i>juglandis</i>	- / -	- / -
CFBP 2532 [†]	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	- / -	- / -
CFBP 2542 [†]	<i>Xanthomonas cucurbitae</i>	- / -	- / -
CFBP 2543 [†]	<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>	- / -	- / -
CFBP 4188 [†]	<i>Xanthomonas cynarae</i>	- / -	- / -
CFBP 4641 [†]	<i>Xanthomonas sacchari</i>	- / -	- / -
LMG 673 [†]	<i>Xanthomonas cassavae</i>	- / -	- / -
CFBP 4644 [†]	<i>Xanthomonas melonis</i>	- / -	- / -
CFBP 4643 [†]	<i>Xanthomonas pisi</i>	- / -	- / -
CFBP 4690 [†]	<i>Xanthomonas codia</i>	- / -	- / -
CFBP4691 [†]	<i>Xanthomonas theicola</i>	- / -	- / -
CFBP 2523 [†]	<i>Xanthomonas albilineans</i>	- / -	- / -
LMG 797 [†]	<i>Xanthomona oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	- / -	- / -
LMG 892 [†]	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	- / -	- / -
LMG 471 [†]	<i>Xanthomonas sacchari</i>	- / -	- / -
Otras bacterias fitopatógenas			
LMG 1222 [†]	<i>Burkholderia cepacia</i>	- / -	- / -
CFBP 2094	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	- / -	- / -
CFBP1670 [†]	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	- / -	- / -

(continuación)

Cepas ^a	Taxón	Respuesta a la PCR anidada Multiplexada ^c	
		amplicones de 694 pb/ 444 pb (marcador PIL)	amplicones de 995 pb/ 401 pb (marcador AVR)
Run 145	<i>Ralstonia solanacearum</i> filotipo III	-/-	-/-
Run 215	<i>Ralstonia solanacearum</i> filotipo I	-/-	-/-
Run 17	<i>Ralstonia solanacearum</i> filotipo II	-/-	-/-
Run 83	<i>Ralstonia solanacearum</i> filotipo IV	-/-	-/-
LMG 1199 [†]	<i>Ralstonia eutropha</i>	-/-	-/-
LMG 2172 [†]	<i>Pseudomonas corrugata</i>	-/-	-/-
LMG 5093 [†]	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	-/-	-/-
LMG 5942 [†]	<i>Ralstonia pickettii</i>	-/-	-/-
LMG 1794 [†]	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-/-	-/-
LMG 16206 [†]	<i>Pseudomonas putida</i>	-/-	-/-
LMG 2162 [†]	<i>Pseudomonas cichorii</i>	-/-	-/-
LMG 2129	<i>Burkholderia andropogonis</i>	-/-	-/-
LMG 2804 [†]	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-/-	-/-
Cepas saprofitas aisladas de cebolla			
JS923, JS924	<i>Erwinia</i> sp.	-/-	-/-
JR593	<i>Burkholderia</i> sp.	-/-	-/-
JR594-1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-/-	-/-
JR594-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	-/-	-/-
JR656-3	<i>Klebsiella</i> sp.	-/-	-/-
JR656-5	<i>Pantoea</i> sp.	-/-	-/-
JR656-6	<i>Pantoea</i> sp.	-/-	-/-
JS741-1	<i>Burkholderia</i> sp.	-/-	-/-
JS741-2, JS741-4, JS741-12	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	-/-	-/-
JS741-5	<i>Klebsiella</i> sp.	-/-	-/-
JS741-6	<i>Pantoea agglomerans</i>	-/-	-/-

(continuación)

Cepas ^a	Taxón	Respuesta a la PCR anidada Multiplexada ^c	
		amplicones de 694 pb/ 444 pb (marcador PIL)	amplicones de 995 pb/ 401 pb (marcador AVR)
JS853	<i>Pantoea sp.</i>	-/-	-/-
JS741-14	<i>Enterobacter sp.</i>	-/-	-/-
JS741-15, JS741-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-/-	-/-

^a CFBP. Colección Francesa de Bacterias Fitopatógenas. Estación de Patología Vegetal, Angers, Francia; BCCMTM/LMG, Colección de bacterias, Laboratorio de Microbiología, Universidad de Gante, Bélgica; NCPPB, la Colección Nacional de Bacterias Patogénicas de Plantas (NCPPB, CSL, York, Reino Unido); Las otras cepas pertenecen a nuestra colección de laboratorio (3P, Reunión. Francia), excepto la cepa LAPAR 306 que ha sido proporcionada por el IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná. Londrina PR. Brasil) y para la que está disponible el genoma completo (Da Silva, 2002).

^b Cepas usadas para los ensayos de patogenicidad en cebolla (*Allium cepa* L., cv. Red Creole).

^c +. Fragmento amplificado del tamaño esperado: -, sin amplicón detectado.

^d Cepas usadas para evaluar los marcadores RAPD (6 cepas).

^e Cepas para las que se ha amplificado y secuenciado el ADN con los cebadores PXaa1U y PXaa1L (18 cepas).

^f Cepas para las que se ha amplificado y secuenciado el ADN con los cebadores PXaa2U y PXaa2L (17 cepas).

^g Cepas usadas para el análisis de restricción con CfrI (3 cepas)

^h Cepas usadas para el análisis de restricción con NheI (12 cepas)

ⁱ Tipo de Cepa

^j Patotipo de Cepa.

Se realizaron ensayos de patogenicidad para todas las cepas de la Tabla II, usando la variedad cultivada de cebolla Red Creole (Roumagnac y col., Eur. J. Plant Pathol., 106: 867-877, 2000). Estos ensayos mostraron que todas las cepas que no pertenecen al patovar *allii* aunque se detecten por PCR anidada multiplexada no son patógenas para la cebolla. Además, estas últimas se pueden distinguir fácilmente de la cepa *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* mediante un análisis de perfil de restricción. De hecho, el análisis de los amplicones obtenidos durante la segunda etapa de amplificación indica que la enzima de restricción *NheI* no escinde el fragmento de 444 pb (amplicón del marcador « PIL ») que proviene de la cepa *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, mientras que escinde el producto de amplificación de la cepa *Xanthomonas euvesicatoria*, generando dos fragmentos de 355 y 89 pb respectivamente. Del mismo modo, la enzima de restricción *CfrI* genera dos fragmentos de 343 y 58 pb a partir del producto de amplificación de 401 pb (amplicón del marcador « AVR ») de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*, mientras que no escinde el amplicón que proviene de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*.

2.2. Sensibilidad de la detección por PCR anidada multiplexada

La sensibilidad del procedimiento de detección por PCR anidada multiplexada se determinó usando suspensiones bacterianas mezcladas o no con muestras de semillas de cebolla.

Las suspensiones de las cepas CFBP 6366, CFBP 6385, CFBP 6367 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* se sometieron a ensayo. Para esto, las suspensiones que contenían 1.10^8 cfu.ml⁻¹ se diluyeron en serie de 10 en 10. Se colocaron muestras que contenían 10 g de semillas de cebollas sanas en 50 ml de tampón estéril Sigma 7-9 0,01 M (pH 7,2) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Francia) y se inocularon con suspensiones bacterianas hasta una concentración final de 1.10^1 cfu.ml⁻¹ a 1.10^7 cfu.ml⁻¹. El control negativo se inóculo con tampón. En paralelo, se analizaron las mismas series de dilución no mezcladas con las semillas. Después de 48 horas de maceración a 4 °C, las muestras se inocularon por una parte sobre medio semiselectivo NCTM1 (Roumagnac y col., Eur. J. Plant. Pathol. ; 106: 867-877, 2000), y por otra parte el genoma bacteriano se extrajo de acuerdo con el procedimiento rápido de extracción alcalina de Audy y col. (Phytopathology ; 86: 361-366, 1993). Se centrifugaron 4 ml de cada muestra a 10 000 g durante 30 min a 4 °C y a continuación el sedimento se volvió a poner en suspensión en 100 µl de NaOH 0,5 N que contenía un 0,5 % de polivinilpirrolidona. Se mezclaron 5 µl de lisado con 495 µl de una solución de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Para cada experimento, se sometieron a ensayo, por duplicado, dos muestras de 5 µl (para las suspensiones que contenían al menos 1.10^4 cfu.ml⁻¹) o tres muestras de 5 µl (para la suspensión se contenían menos de 1.10^4 cfu.ml⁻¹).

Cuando las suspensiones se mezclan con semillas de cebollas, la primera etapa de la amplificación permite detectar 1.10^6 cfu.ml⁻¹ (título determinado con las suspensiones correspondientes inoculadas sobre medio NCTM1). Cuando se usa la PCR anidada multiplexada, el límite de detección aumenta aproximadamente 1.10^3 cfu.ml⁻¹, aunque

frecuentemente se obtiene una señal (una o dos veces de cada tres ensayos) con suspensiones que contienen aproximadamente 1.10^2 cfu.ml⁻¹. Se debe indicar que los ensayos equivalentes realizados sobre las dilución es en serie que no se mezclaron con las semillas de cebolla proporcionaron resultados similares.

5 Estos resultados muestran que la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* es posible en una muestra de semillas a partir de una concentración de 10^6 bacterias/ml después de la primera etapa de amplificación, y que a partir de una concentración de 10^3 bacterias/ml o 10^2 bacterias/ml después de la segunda etapa de amplificación.

Ejemplo 3: Detección de *Xanthomonas Axonopodis* pv. *Allii* en muestras de semillas infectadas

10 La presencia de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* se investigó en un lote de semillas de cebollas cosechadas en un campo experimental contaminado (Humeau y col., Phytopathology, 96: 1345-1354, 2006). El número de muestras para cada experimento (35 por experimento), que consiste cada uno en 10 g de semillas, se determinó de acuerdo con una distribución hipergeométrica con el fin de detectar al menos una semilla contaminada con respecto a 30 000 semillas ($r = 0,05$). Cada experimento se realizó por duplicado.

15 Las muestras de semillas se maceran en 50 ml de tampón estéril Sigma 7-9 0,01 M (pH 7,2) durante 48 horas. La tasa de contaminación del lote se determinó, por una parte, mediante cultivo en medio NCTM1 de macerados puros o diluidos a una décima parte, y por otro lado con al menos dos análisis de macerados por PCR anidadas multiplexadas después de extracción alcalina realizada como se ha descrito anteriormente. Los controles negativos en los que la muestra sustituyó por agua se incluyeron los experimentos.

20 En otra serie de experimentos, el mismo lote de semillas se mezcló con semillas de cebollas sanas en una proporción de 1:1,1, 1:2 y 1:12,8, y a continuación la tasa de contaminación de dos, 2:03 muestras independientes de estas mezclas se analizaron respectivamente por cultivo en medio NCTM1 y PCR anidada multiplexada en las condiciones indicadas anteriormente.

25 Se sabe que el procedimiento de amplificación por PCR anidada producen falsos positivos, solamente las muestras a partir de las que se detectaron los fragmentos de ADN esperados al menos dos veces se consideran como positivos. Además, se calculó la tasa de contaminación determinada a partir del recuento de placas inoculadas y análisis por PCR anidada multiplexada de acuerdo con el procedimiento descrito en Masmoudi y col. (Seed Sci. Technol. ; 22: 407-414, 1994). La correlación entre las tasas de contaminación determinadas por cultivo o por PCR anidada multiplexada y la relación de las diluciones de semillas infectadas / semillas sanas se calculó aplicando el coeficiente de correlación de Pearson r (Pearson, K., Biometrika ; 18: 105-117, 1926).

Los resultados de estos estudios se presentan en la Tabla III que sigue a continuación.

30

TABLA III

		Nº de muestras de semillas	Detección por PCR anidada Multiplexada		Aislamiento en medio semiselectivo		Número de lotes detectados con los 2 procedimientos
			TC	Nº de lotes positivos	TC	Nº de lotes positivos	
Lote de semillas P2 1/10.000 ^a	Ensayo 1	35	0,00007675	6	0,00004953	4	3
	Ensayo 2	35	0,0001213	9	0,00001183	1	1
	media		0,00010		0,00003068		
Lote de semillas P2 mezcla con semillas sanas (1:1,1) 1/21.000 ^b	Ensayo 1	35	0,00003658	3	0	0	0
	Ensayo 2	35	0,00004953	4	0,00002402	2	0
	media		0,000043055		0,00001201		
Lote de semillas P2 mezclado con semillas sanas (1:2) 1/30000 ^b	Ensayo 1	35	0,00003658	3	0	0	0
	Ensayo 2	35	0,00003658	3	0,00001183	1	0
	media		0,00003658		0,000005915		

(continuación)

		Nº de muestras de semillas	Detección por PCR anidada Multiplexada		Aislamiento en medio semiselectivo		Número de lotes detectados con los 2 procedimientos
			TC	Nº de lotes positivos	TC	Nº de lotes positivos	
Lote de semillas P2 mezclado con semillas sanas (1:12,8) 1/138.000 ^b	Ensayo 1	35	0	0	0,00001183	1	0
	Ensayo 2	35	0	0	0	0	0
	Ensayo 3	35	0,00003658	3	0,00001183	1	0
	media		1,21933E-05		0,0000079		
Semillas sanas	Ensayo 1	35	0	0	0	0	
	Ensayo 2	35	0	0	0	0	

^a Tasa de contaminación de semillas derivadas de los análisis por PCR Anidada multiplexada
^b Tasa de contaminación de semillas teóricas obtenidas diluyendo el lote de semillas P2 con semillas sanas

5 Los dos procedimientos de análisis permitieron la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*: se pusieron de manifiesto seis y nueve muestras positivas por PCR anidada multiplexada, lo que corresponde a una tasa de contaminación media de un 0,01 %, mientras que el cultivo en medio NCTM1 no permitió detectar más que tres y cuatro muestras positivas, lo que corresponde a una tasa de contaminación de un 0,0031 %.

10 La serie de experimentos realizados con el lote de semillas mezcladas con semillas de cebollas sanas en una proporción de 1:1, 1:2 y 1:12,8, que corresponden respectivamente a tasas de contaminación teóricas de 1/21 000, 1/30 000 y 1/138 000, muestra que el procedimiento por PCR anidada multiplexada calcula de forma precisa las tasas de contaminación: de hecho, la correlación positiva *r* entre la tasa de contaminación teórica y la tasa de contaminación determinada experimentalmente por PCR anidada multiplexada es de 0,90. Por el contrario, no se observó tal correlación cuando el análisis se realizó mediante cultivo en medio NCTM1.

15 En una tasa de contaminación determinada de forma experimental de 1/27 300, la PCR anidada multiplexada es positiva en cada ensayo. Para las diluciones superiores, en particular 1/82 000, solamente es positivo un ensayo de cada tres.

Siendo el nivel de contaminación informado para las epidemias de debilitamiento bacteriano de la cebolla en medio tropical de 4,5/10 000, la detección por PCR anidada multiplexada, con un umbral de sensibilidad del procedimiento de aproximadamente 1/27 300, es fiable y en particular se adapta bien para certificar los lotes de semillas de aliáceas.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> CIRAD
 ROBENE, Isabelle
 PRUVOST, Olivier
 LEGRAND, Delphine

<120> NUEVAS HERRAMIENTAS PARA LA DETECCIÓN DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV.ALLII

30 <130> MJP/EM/11-F1367-18WO

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.3

35 <210> 1
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 538 825 T3

<220>
 <223> Cebador Pxaa1U

 5 <400> 1
 ggctctaata cgacgttgac gat 23

 <210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador Pxaa1L

 15 <400> 2
 aaattcatgc gcgtttcaa tag 23

 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador Nxaa1U

 25 <400> 3
 ttacgtcgca aacaatccag ata 23

 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador Nxaa1L

 35 <400> 4
 gggcaccatt gacattatca gtt 23

 <210> 5
 <211> 937
 <212> ADN
 <213> *Xanthomonas axonopodis*

 45 <400> 5

ES 2 538 825 T3

acggcgcagc tacttcgcca gggcaaacgg taacagttgg ggcaaacgca ggttcgatta 60
 ccgggctgcc tgctgcgatc cagaacctga gcccgggccc gcgggctggg agcgacatca 120
 tcgtcttacg gtttctttcc gctgaggggg ttcttgccac gggcattgcg gcggcgggct 180
 ctaatacgcg gttgacgatg gacgctaccc gctgggagag gttgacggat gatggcgctc 240
 cagcaccgac gctgttcgga atcgcgact gcgcgcacgc cgatgtggtt gcaggcacga 300
 ccactgctgg aacagtggtg gcctcaggag taaaccttgc cggtcgatat gttgtacagc 360
 ccactggcca gaccatggtg tatcgcgccg aatcgcttgt gtattacgtc gcaacaatc 420
 cagatacagg ggaaccgca ttgocggctg ccagagcagg aggtaacggc cagtacacca 480
 gcgaggaact ggtagagggc atogaaagcc tgcaattcct ttatggactg gacagcaccg 540
 aaaccattgc aacgcaaac ccaccgctg gaaacattac ggagcagagg gttgcgagca 600
 gtgttgcaac agcaactggc gcagcagctg ccaatcaatg gcggcgggtc ggtcaagtgc 660
 aggttgaggt gcttgtgctg agtcgactc cagctgotgc tgctgctccg attgaggcca 720
 atcgtcttgg tgtgctcggg gtaacgggtg ttccacctac gactagcgat gggcggatc 780
 gggccacctg tgagttgtca gtcgctctcc gtaaccgact gttcggtaac tgataatgtc 840
 aatggtgcc ctattgaaa cgcgcatgaa ttgaaaatc ggagctggcc ggcaaacggg 900
 tgccgtctc tatgtcgtc tgatcatcct ggccgct 937

<210> 6
 <211> 1948
 <212> ADN
 <213> *Xanthomonas axonopodis*

<400> 6

attatccgcg cattgtcgac ggcgtgcatg ccgaaacgaa gtgcagatgc gctagccaag 60
 catagcgctc catggcaccg ccaagcggca gtgcaaacaa ccggtatgtc gacccgaggt 120
 gtgctgcgtc caatggact aatccacggc cgtggccggg cttttttggg gtcggttagt 180
 caccgaacat cagttgcgca gatcactctt cagtgtgaat tagtgtcgtc tatctgtagt 240
 gcttcgttca gggtttttca gcttttcgca ttattgccta gatcttcgcg caacgaaacc 300
 gagttcttcg attagcgcga tctaataat gtgcgactcc ataagagtgc aattcagatc 360
 catacaaaaa atggtggtaa aaaatgaaga aatttttcag atcattagga gtggggggct 420
 caagcagcag tcgttttcaa catcatattc cggaggctga ctcagcacc agcagtaagg 480
 cgtctacgcc tccggcctct ccgcccggg attcccggc cagtaactct gctttttcgg 540
 ctctcccgc aaggcctcgc aagaaggccg aggccttgtc ggatgcggtg gagtcgcgcg 600

5

10

ES 2 538 825 T3

gacatttagc cccgccaaagc ctggtctcct atgccaaagc aacccttgat caactgagge 660
gaaatgaacc catcagcgag tcaacttcggc tgatggacat tgaaaatctc ccccatctgg 720
tccgctccta cgacaataga ttgaataatc taaaactgag cagcttcgac actccggggc 780
agtttttaca tgacctgagt cgctggcata aacaggatt gccattaaga gcggtagtgc 840
ggctggatga agaccctagg agatggcatc gcgtogcggt cgacgtgagc aaccacgaga 900
gtggacacac gacgattatc gcattggagc ctgcgtctgc ttacaatccg gaccatattc 960
ctggtttcgt gaaaatgaga gaaaatctca cgtctcagtt cggtaggaaa atttcgtttg 1020
ctgtgattga ggcggaagca cttaatgcaa tcgggtgggtg tgtcatatct tctcttgatt 1080
atgccctggc ggcataaccag gaaagaagca cctttgacca atggcataaa gatcttcgaa 1140
agaaaggaaa tatcaagggg atgactcccg aaagtacgca ccttaacgag cttggcgtct 1200
atttgcttaa aggaaccagg ttgctgcggc caaacttcta caagcatgag cattccagggc 1260
gcaccatcga cgagctcgag gcagatcagc ctggcgcgtc gggtagcgac gtgaggtcag 1320
gcagagccgc tgtctacaag gagtcgctga gccgtagact ggaggagttc caggctccagc 1380
gcgataagac ctacagcatg tcaatcgaag catccagagc tcgaaagatc cgtaacgcct 1440
tagaatcctg agacaattac caaatattat ttactttcct taccttcaca ggcccgcctc 1500
ccagcgggct ttttttcggg atgtaataag gcgaacctga tggaaagcgc aacggcagggc 1560
ttgtcgaatg aggtttgctg tgtctgaagg gcttgtcgct acgccaggca ggatcatcca 1620
gtggcagcag ctgccggcgc atcgtgacag ataccgagagc gcaagcgagc tcagcactgg 1680
cgccgtgttc ttggccatgc cgcaatctg aacttgggtg aaccaacctg acgcttgatc 1740
gaggttcctt agcacaccgc aacattgagc ggctgccccg gccgctgagc tgggaaatca 1800
tccgctgcac tgcgctcgtt cacctggcac acgcgcgcat ctgcgtctac cagcgttcgc 1860
ggttgctgcc ggggggtttt ccagcctgag cggcgagccg gcaagctcgc cggcaggtgt 1920
tcagttggcc aacgccagat ccgtcaac 1948

5 <210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador Pxaa2U

<400> 7
ctcaagcagc agtcgtttc a 21

15 <210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador Pxaa2L

	<400> 8 atgcttcgat tgacatgctg t	21
5	<210> 9 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador Nxaa2U	
15	<400> 9 atgcctgggt tcgtgaa	17
20	<210> 10 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador Nxaa2L	
25	<400> 10 ctacggctca gcgactc	17
30	<210> 11 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador 80-21	
35	<400> 11 acgcgccagg	10
40	<210> 12 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador PSAC	
50	<400> 12 tagactgcgt acaagtc	18
55	<210> 13 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador PMSP	
60	<400> 13 gatgagtctt gagcgg	16
60	<210> 14 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Cebador MSPI	

	<400> 14 gatgagtctt gagcgg	16
5	<210> 15 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador Sacl + CT	
15	<400> 15 tagactgcgt acaagctcc	19
20	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador Sacl + CT	
30	<400> 16 tagactgcgt acaagctct	20
35	<210> 17 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador F1154	
45	<400> 17 gaccatagc ctggttcg	19
50	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador R1391	
60	<400> 18 cctaagggtg ctgacttcg	20
65	<210> 19 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Cebador F202	
75	<400> 19 attatccgcg cattgtcg	18
80	<210> 20 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Cebador R2149	

<400> 20
gttgacggat ctggcgtg

19

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polinucleótido aislado, susceptible de obtención a partir de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, definido con la secuencia SEC ID N°: 6 para la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*.
2. Procedimiento de cribado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, **caracterizado porque** comprende:
 - 5 - poner en presencia de ADN una muestra biológica susceptible de contener dicha bacteria con uno o varios polinucleótidos de acuerdo con la invención, en condiciones que permitan una hibridación selectiva entre dicho o dichos polinucleótidos y la secuencia diana SEC ID N°: 6, si ésta está presente en dicho ADN;
 - detectar dicha hibridación.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** comprende las etapas siguientes :
 - 10 i) poner en presencia de ADN una muestra biológica a someter a ensayo con un par de cebadores de acuerdo con la invención, en condiciones que permiten una hibridación selectiva entre los cebadores y la secuencia diana SEC ID N°: 6 ;
 - ii) realizar una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa en condiciones que permitan la amplificación de la secuencia diana SEC ID N°: 6;
 - 15 iii) detectar el producto de amplificación.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** comprende además una etapa iv) que es una amplificación en cadena de la polimerasa con la ayuda de un segundo par de cebadores que permiten la amplificación de un fragmento interno del producto de amplificación de la etapa ii).
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizado porque** el ADN de la muestra se pone además en presencia de al menos un polinucleótido capaz de hibridarse selectivamente, en condiciones rigurosas, con la secuencia diana SEC ID N°: 5.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, **caracterizado porque**, en la etapa i), el ADN de la muestra se pone además en presencia de uno o varios polinucleótidos capaces de hibridarse selectivamente, en condiciones rigurosas, con la secuencia diana SEC ID N° : 5, y **porque** las condiciones de la etapa ii) permiten, además de la amplificación de la secuencia diana SEC ID N°: 6, la amplificación de la secuencia diana SEC ID N°: 5.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** la etapa de amplificación iv) se realiza además en presencia de un par de cebadores que permiten la amplificación de un fragmento interno del producto de amplificación de la primera etapa de amplificación del polinucleótido de secuencia SEC ID N°: 5.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** la etapa de amplificación ii) se realiza con el par de cebadores PXaa1U (SEC ID N°: 1) y PXaa1L (SEC ID N°: 2) y el par de cebadores PXaa2U (SEC ID N°: 7) y PXaa2L (SEC ID N°: 8), y **porque** la etapa de amplificación iv) se realiza con el par de cebadores NXaa1U (SEC ID N°: 3) y NXaa1L (SEC ID N°: 4) y el par de cebadores NXaa2U (SEC ID N°: 9) y NXaa2L (SEC ID N°: 10).
9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, **caracterizado porque** la muestra biológica es una semilla de aliícea.
10. Kit de detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, **caracterizado porque** comprende uno o varios polinucleótidos capaces de hibridarse selectivamente, en condiciones rigurosas, con la secuencia diana SEC ID N°: 6 y uno o varios polinucleótidos capaces de hibridarse selectivamente, en condiciones rigurosas, con la secuencia diana SEC ID N°: 5.
11. Kit de detección de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** comprende los pares de cebadores de amplificación siguientes:
 - el par de cebadores constituido por los polinucleótidos PXaa1U (SEC ID N°: 1) y PXaa1L (SEC ID N°: 2) ;
 - el par de cebadores constituido por los polinucleótidos NXaa1U (SEC ID N°: 3) y NXaa1L (SEC ID N°: 4) ;
 - el par de cebadores constituido por los polinucleótidos PXaa2U (SEC ID N°: 7) y PXaa2L (SEC ID N°: 8) ; y
 - el par de cebadores constituido por los polinucleótidos NXaa2U (SEC ID N°: 9) y NXaa2L (SEC ID N°: 10).

ES 2 538 825 T3

1 ATTATCCGCG CATTGTCGAC GGC GTGCATG CCGAAACGAA GTGCAGATGC GCTAGCCAAG
 TAATAGGCGC GTAACAGCTG CCGCACGTAC GGCTTTGCTT CACGTCTACG CGATCGGTTT

61 CATAGCGCTC CATGGCACCG CCAAGCGGCA GTGCAAACAA CCGGTATGTC GACCCGAGGT
 GTATCGCGAG GTACCGTGGC GGTTTCGCCGT CACGTTTGTG GGCCATACAG CTGGGCTCCA

121 GTGCTGCGTC CAATGCGACT AATCCACGGC CGTGGCCCGG CTTTTTTGGG GTCGGTTAGT
 CACGACGCAG GTTACGCTGA TTAGGTGCCG GCACCGGGCC GAAAAAACCC CAGCCAATCA

181 CACCGAACAT CAGTTGCGCA GATCACTCTT CAGTGTGAAT TAGTGTGCTT TATCTGTAGT
 GTGGCTTGTA GTCAACGCGT CTAGTGAGAA GTCACACTTA ATCACAGCGA ATAGACATCA

241 GCTTCGTTCA GGGTTTTTCA GCTTTTCGCA TTATTGCCTA GATCTTCGCG CAACGAAACC
 CGAAGCAAGT CCCAAAAAGT CGAAAAGCGT AATAACGGAT CTAGAAGCGC GTTGCTTTGG

301 GAGTTCTTCG ATTAGCGCGA TCTAATATAT GTGCGACTCC ATAAGAGTGC AATTCAGATC
 CTCAAGAAGC TAATCGCGCT AGATTATATA CACGCTGAGG TATTCTCACG TTAAGTCTAG

361 CATACAAAAA ATGGTGGTAA AAAATGAAGA AATTTTTTCAG ATCATTAGGA GTGGGCGGCT
 GTATGTTTTT TACCACCATT TTTTACTTCT TTAAAAAGTC TAGTAATCCT CACCCGCCGA

└─┬─▶

421 **PXaa2U**
CAAGCAGCAG TCGTTTTCAA CATCATATTC CGGAGGCTGA CTCAGCACCC AGCAGTAAGG
 GTTCGTCGTC AGCAAAAAGT GTAGTATAAG GCCTCCGACT GAGTCGTGGG TCGTCATTCC

481 CGTCTACGCC TCCGGCCTCT CCGCCGCCGG ATTCCCGGCC CAGTAACTCT GCTTTTTCCG
 GCAGATGCGG AGGCCGGAGA GCGCGCGGCC TAAGGGGCGG GTCATTGAGA CGAAAAAGGC

541 CTCTCCCGAC AAGGCCTCGC AAGAAGGCCG AGGCCTTGTC GGATGCGGTG GAGTCGCGCG
 GAGAGGGCTG TTCCGGAGCG TTCTTCCGGC TCCGGAACAG CCTACGCCAC CTCAGCGCGC

601 GACATTTAGC CCCGCCAAGC CTGGTCTCCT ATGCCAACGC AACCCCTGAT CAACTGAGGC
 CTGTAAATCG GGGCGGTTTC GACCAGAGGA TACGGTTGCG TTGGGAACTA GTTACTCCG

661 GAAATGAACC CATCAGCGAG TCACTTCGGC TGATGGACAT TGAAAATCTC CCCCATCTGG
 CTTTACTTGG GTAGTCGCTC AGTGAAGCCG ACTACCTGTA ACTTTTAGAG GGGGTAGACC

721 TCCGCTCCTA CGACAATAGA TTGAATAATC TAAACCTGCG CAGCTTCGAC ACTCCGGGGC
 AGGCGAGGAT GCTGTTATCT AACTTATTAG ATTTGGACGC GTCGAAGCTG TGAGGCCCCG

781 AGTTTTTACA TGACCTGAGT CGCTGGCATA AAACAGGATT GCCATTAAGA GCGGTAGTGC
 TCAAAAATGT ACTGGACTCA GCGACCGTAT TTTGTCTTAA CGGTAATTCT CGCCATCACG

841 GGCTGGATGA AGACCCTAGG AGATGGCATC GCGTCGCGTT CGACGTGCGC AACCACGAGA
 CCGACCTACT TCTGGGATCC TCTACCGTAG CGCAGCGCAA GCTGCACGCG TTGGTGTCTT

Figura 1a

ES 2 538 825 T3

901 GTGGACACAC GACGATTATC GCATTGGAGC CTGCGTCTGC TTACAATCCG GACCATATGC
CACCTGTGTG CTGCTAATAG CGTAACCTCG GACGCAGACG AATGTTAGGC CTGGTATACG

┌───▶

NXaa2U

961 **CTGGTTTCGT** GAAAATGAGA GAAAATCTCA CGTCTCAGTT CGGTAGGAAA ATTCGTTTTG
GACCAAAGCA CTTTTACTCT CTTTTAGAGT GCAGAGTCAA GCCATCCTTT TAAAGCAAAC

1021 CTGTGATTGA GGCGGAAGCA CTTAAGTCAA TCGGTGGGTG TGTCATATTT TCTCTTGATT
GACACTAACT CCGCCTTCGT GAATTCAGTT AGCCACCCAC ACAGTATAAA AGAGAACTAA

1081 ATGCCCTGGC GGCATACCAG GAAAGAAGCA CCTTTGACCA ATGGCATAAA GATCTTCGAA
TACGGGACCG CCGTATGGTC CTTTCTTCGT GGAAACTGGT TACCGTATTT CTAGAAGCTT

1141 AGAAAGGAAA TATCAAGGGG ATGACTCCCG AAAGTCAGCA CCTTAACGAG CTTGGCGTCT
TCTTTCCTTT ATAGTTCCTT TACTGAGGGC TTTCAGTCGT GGAATTGCTC GAACCGCAGA

1201 ATTTGCTTAA AGGAACCAGG TTGCTGCCGG CAAACTTCTA CAAGCATGCG CATTCCAGGC
TAAACGAATT TCCTTGGTCC AACGACGGCC GTTTGAAGAT GTTCGTACGC GTAAGGTCCG

1261 GCACCATCGA CGAGCTCGAG GCAGATCAGC CTGGCGCGTC GGGTACCGAC GTGAGGTCAG
CGTGGTAGCT GCTCGAGCTC CGTCTAGTCG GACCGCGCAG CCCATGGCTG CACTCCAGTC

NXaa2L

1321 GCAGAGCCGC TGTCTACAAG GAGTCGCTGA GCCGTAGACT GGAGGAGTTC CAGGTCCAGC
CGTCTCGGCG ACAGATGTTT **CTCAGGACT** **CGGCATCTGA** CCTCCTCAAG GTCCAGGTCC

←──┐

PXaa2L

1381 GCGATAAGAC CTACAGCATG TCAATCGAAG CATCCAGAGC TCGAAAGATC CGTCACGCCT
CGCTATTCTG **GATGTCGTAC** **AGTTAGCTTC** **GTAGGTCTCG** AGCTTTCTAG GCAGTGCGGA

←──┐

1441 TAGAATCCTG AGACAATTAC CAAATATTAT TTACTTTCCT TACCTTACAC GGGCCGCTTC
ATCTTAGGAC TCTGTTAATG GTTTATAATA AATGAAAGGA ATGGAAGTGT CCGGGCGAAG

1501 CCAGCGGGCT TTTTTCGGT ATGTAATAAG GCGACCCTGA TGGAAAGCGC AACGGCAGGC
GGTCGCCCCA AAAAAAGCCA TACATTATTC CGCTGGGACT ACCTTTCGCG TTGCCGTCCG

1561 TTGTCGAATG AGGTTTGCTG TGTCTGAAGG GCTTGTGCTG ACGCCAGGCA GGATCATCCA
AACAGCTTAC TCCAAACGAC ACAGACTTCC CGAACAGCGA TGCGGTCCGT CCTAGTAGGT

1621 GTGGCAGCAG CTGCCGGCGC ATCGTGACAG ATACGAGAGC GCAAGCGACG TCAGCACTGG
CACCGTCGTC GACGGCCGCG TAGCACTGTC TATGCTCTCG CGTTGCTGCTC AGTCGTGACC

1681 CGCCGTGTTT TTGGCCATGC CGCGAATCTG AACTTGGTGC AACCAACCTG ACGCTTGATC
GCGGCACAAG AACCGGTACG GCGCTTAGAC TTGAACCACG TTGTTGGAC TCGGAAGTAG

1741 GAGGTTCCCT AGCACACCGC AACATTGCGC GGCTGCGGGC GCCGCTGACG TGGGAAATCA
CTCCAAGGAA TCGTGTGGCG TTGTAACGCG CCGACGCCCC CGGCGACTGC ACCCTTTAGT

Figura 1b

1801 TCCGCTGCAC TCGCTCGTT CACCTGGCAC ACGCGCGCAT CTGCGTCTAC CAGCGTTTCGC
AGGCGACGTG ACGCGAGCAA GTGGACCGTG TCGCGCGTA GACGCAGATG GTCGCAAGCG

1861 GGTGCTGCC GGGCGTTTT CCAGCCTGCG CGGCGAGCCG GCAAGCTCGC CGCGCAGTGT
CCAACGACGG CCCCACAAA GGTGCGACGC GCCGCTCGGC CGTTCGAGCG GCGCGTCACA

1921 TCAGTTGCC AACGCCAGAT CCGTCAAC
AGTCAACCGG TTGCGGTCTA GGCAGTTG

Figura 1c

FIGURA 1

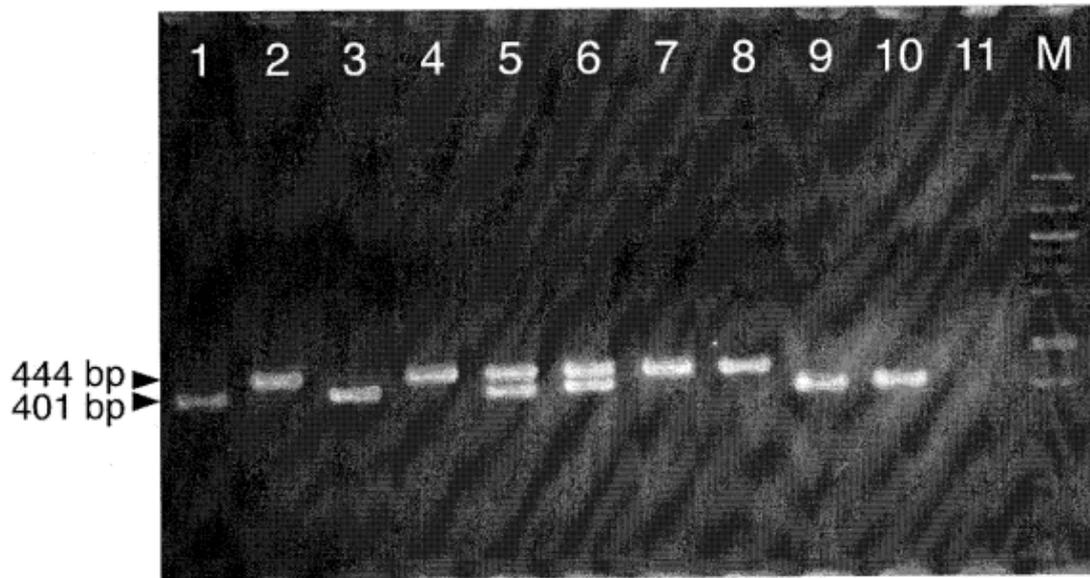


FIGURA 3