

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 665**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2010 PCT/IB2010/053563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2012 WO12017271**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2010 E 10747078 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2601305**

54 Título: **Una secuencia específica para el fitoplasma de la flavescence dorée (fd), usos y kit diagnósticos de fd**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2017

73 Titular/es:
**INTERNATIONAL PLANT ANALYSIS AND
DIAGNOSTICS S.R.L. (100.0%)
Via Einstein snc Loc. Cascina Codazza
26900 Lodi, IT**

72 Inventor/es:
**BIANCO, PIERO ATTILIO;
CASATI, PAOLA y
DURANTE, GIUSEPPE**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 627 665 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).

DESCRIPCION

Una secuencia específica para el fitoplasma de la flavescente dorée (fd), usos y kit diagnósticos de fd

5 A la presente invención fue concedida una licencia de clasificación extranjera emitida por Ministero Dello Sviluppo Economico, U.I.B.M. Divisione XI, el 26 de mayo de 2010, el Protocolo número 59395.

10 La presente invención se relaciona con una nueva secuencia genómica específica para el fitoplasma que causa la Flavescente dorée (FD) en las vides, a un método para el diagnóstico de la FD en las vides y separa de eso incluyendo rizomas, y a un kit para la detección de los agentes fitoplasma de la FD en muestras de la planta.

ESTADO DEL ARTE

15 Los amarillos de la vid (GY: grapevine yellows), un complejo de las enfermedades que al principio se pensaba que estaban causadas por virus, que tenían una etiología fitoplasma. La primera enfermedad GY descrita para *Vitis vinifera*, y la más extensamente conocida entre las enfermedades GY, es indudablemente la Flavescente dorée (FD), que fue relatada por primera vez en Francia del sudoeste en los años 1950 (Caudwell, 1957), y luego extendida a otros distritos vitícolas de Francia, Italia del norte y países europeos vecinos, incluyendo España, Portugal y Serbia.

20 Bois noir (BN), cuyos síntomas son indistinguibles de aquellos de la FD, también primero fue relatado de Francia, y luego de las áreas vitícolas más importantes de Europa.

25 Los síntomas casi idénticos del síndrome GY son causados por fitoplasmas diferente y aparecen sobre las hojas, brotes y los racimos de vid. Síntomas típicos incluyen la decoloración y la necrosis de venas de hoja y láminas de hoja, hacia abajo el rizar de hojas, falta o lignificación incompleta de brotes, atrofiando y la necrosis de brotes, el aborto de inflorescencias y marchitar de bayas.

30 Aquellos síntomas son relacionados con la deposición callosa en las placas de tamiz y la subsecuente degeneración del líber. Aunque no se conozca ninguna especie cultivadas resistentes de *Vitis vinifera* o rizomas hasta ahora, varias variedades de uvas se diferencian bastante por lo que la severidad de síntoma está preocupada. Esto se extiende de la disminución rápida y la muerte en especies cultivadas sumamente susceptible a rizomas tolerantes como los portadores del patógeno sin síntomas.

35 Los fitoplasmas son agentes patógenos microscópicos de la planta, similares a la bacteria, pero mucho más pequeños. Ellos son limitados por líber, procariotas no helicoidal y sin la pared (Firrao, G. et Al-, 2004.). De manera diferente los virus de forma, fitoplasmas tienen su propio metabolismo, un metabolismo sumamente reducido, y algunas moléculas esenciales para su supervivencia son adquiridas del huésped.

40 Ellos representan un monofilético clade dentro de la clase de las Mollicutes, que actualmente es dividida en al menos 15 subgrupos sobre la base de los análisis de secuencia de varios genes conservados. Un nuevo taxón, 'Candidatus Fitoplasma' ha sido establecido y varios grupos o subgrupos han sido descritos recientemente como la especie 'California. Fitoplasma'.

45 Los genomas llenos de cuatro fitoplasmas son ordenados, ofreciendo nuevas informaciones sobre su biología y su interacción con la planta y los huéspedes del insecto ("Ca. Phytoplasma asteris" tiran A-VER-WB NC_007716 Y OY NC_005303 "la Ca. P. mali" NC_011047, "Ca. P. australiense" NC_010544).

50 Los datos disponibles confirman su falta de genes para el metabolismo autónomo y su dependencia del parasitismo intracelular. Fitoplasmas de varios grupos han sido encontrados para ser consistentemente asociados con GY. Ellos se propagan por un insecto vector; también la propagación de vid infectadas hechas por el hombre contribuye a GY que extiende sobre de larga distancia. Esto implica un alto riesgo de diseminación de GY a regiones donde nuevos brotes podrían ser provocados si vectores competentes existían o también serían presentados.

55 Sin embargo, GY tienen diferentes especies de fitoplasma como agente causal, así como el diferentes vectores de insectos que es leafhoppers o tolvos de planta (Homoptera: Auchenorrhyncha) que se alimenta expresamente o ocasionalmente sobre las vides. Vale la pena notar que dos o más especies diferentes de fitoplasma puede infectar simultáneamente la misma vid, así causando infecciones surtidas.

60 Aunque los fitoplasmas no sean microorganismos cultivables y, en el caso de GY, los postulados de Koch aún no han sido realizados, cuando fitoplasmas de un específico grupo o subgrupo es encuentran coherentemente asociados con una enfermedad específica de uvas, son considerados sus agentes causales. De hecho, la identificación de los

fitoplasmas como causa de GY fue hecha posible durante las décadas pasadas por métodos de detección molecular, que permiten distinguir una de otra las especies de fitoplasma envueltas en cada etiología de enfermedad.

5 La clasificación de fitoplasmas, que son incultivables y actualmente descritos bajo el género provisional "Candidatus Phytoplasma" está principalmente basada en 16 rRNA el gene filogenia, en la diversidad genómica, y en la variedad de huéspedes de la planta y de los insectos. Fitoplasmas son asociados con la GY.

10 En 2003 Boudon-Padieu (Boudon-Padieu, E., 2003) catalogó varios fitoplasmas que fueron encontrados para ser coherentemente asociados con GY. El fitoplasma de Stolbur (16SrXII-A), el agente causal de Bois noir (BN), fue relatado de la vid en Chile y fitoplasmas del mismo grupo, pero también del grupo de 16SrI (el áster yellows) fue identificado en cultivar Syrah en Francia. BN ahora ha sido relatado también en Canadá. Stolbur fitoplasma también fue identificado en vides infectadas GY en Ucrania, y podrían confirmar su presencia en Serbia.

15 Recientemente, los brotes nuevos y repetidos de BN causaron problemas en varias regiones vitícolas en Europa. Estos datos confirman que BN es una enfermedad endémica en Europa, Asia Menor y Mediterráneo. El áster yellows (la 16SrI-b), el trébol phyllody (16SrI-C) y el olmo yellows (la 16Sr-v) fitoplasmas fue encontrado esporádicamente en vides infectadas GY en Italia (18), y la infección de vid por el áster yellows (la 16SrI-b) fitoplasma fue relatada de Túnez. Infección de papaya y vid por "California. Fitoplasma australiense" fue relatado de Israel, sin embargo, la confusión con stolbur fitoplasma, que es también presente en esta región, es posible. Un estudio en Italia reveló la presencia de GY en el 80 % de los viñedos inspeccionados.

25 BN es extendido en todo el país mientras que la Flavescence dorée (FD) principalmente es restringido a las regiones del norte. Recientemente, la presencia de vides infectadas por fitoplasmas de la FD/C ha sido relatada en Eslovenia y Serbia. La FD fitoplasma pertenece al 16SrV el grupo taxonómico (Lee et al., 2000) y esta es la enfermedad más importante y el fitoplasma más destructivo de la vid y su causar fitoplasmas muestra una alta especificidad vector, que es transmitido en condiciones naturales sólo por el saltahoja *S. titanus* (Hemiptera: Cicadellidae).

30 *S. titanus* pasa su ciclo de vida entero sobre la vid. Esto es vector sumamente móvil y eficiente que es en gran parte responsable de la extensión epidémica de la FD. Tanto las ninfas como adultos son capaces de adquirir el fitoplasma alimentando. Después de un periodo latente ellos son capaces de transmitir la enfermedad hasta su muerte. La FD fue llamada "catastrófica" en Francia, y es tan severo que en Unión Europea es sujeto de poner en cuarentena.

35 Las vides infectadas por la enfermedad son caracterizadas por las alteraciones en color de las hojas (el amarilleo o enrojeciendo), bajo de la lignificación de brotes y de la sequedad de manojos. Los impactos incluyen la vitalidad reducida de vides, reducciones de producción, y la calidad de vino reducida debido al alto contenido ácido y bajo de azúcar de fruta de plantas infectadas. Ningunos síntomas o síntomas muy débiles son visibles sobre el rizoma más popular. Este hecho juega un papel crítico en la extensión de la FD, y mandos sólo ampliados y continuos bio moleculares pueden ayudar en el cuidado de la planta de vid de madre libre de fitoplasmas.

40 Cuando ningunas medidas de control son usadas, en la presencia del insecto vector, las enfermedades se difunden rápidamente, infectando hasta el 80-100 % de vides dentro de unos años. La FD ha destruido grandes áreas vitícolas en Francia e Italia, y esto se extiende por todas partes de Europa del sur a pesar de programas de control obligatorios. Cultivars popular como Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Pinot noir, el Riesling, Sauvignon blanc, y Sémillon es sumamente susceptible a la FD. Algún cultivars como Sangiovese y Garganega es sumamente susceptible, y, de ser inoculadas con frecuencia, las plantas fuertes son dañadas; a veces las vides infectadas no pueden sobrevivir a la temperatura del invierno, y mueren.

50 La FD es causada por dos variedades de fitoplasma: el primero pertenece al grupo taxonómico 16SrVD, y el segundo pertenece al grupo taxonómico 16SrVC.

55 La detección confiable de fitoplasmas en la vid es todavía un desafío aunque una amplia variedad de instrumentos diagnósticos esté disponible. Cada año causan problemas titres del patógeno que temporalmente fluctúan, y distribución irregular en vides infectadas. La inspección visual es impedida por la infección latente en algunos rizomas y los largos periodos de infección sin síntomas en *Vitis vinifera*.

60 Como a partir de 1982, anticuerpos monoclonales y antisuero polyclonal fueron producidos para la detección de fitoplasmas de la FD por la inmunización de conejos con extractos parcialmente purificados de la FD-infected *Vicia faba* plantas o de vector experimental *E. variegatus*. Estos antisueros también fueron usados para observar fitoplasmas mediante la microscopía inmunosorbent de electrones (ISEM) y la microscopía de luz de fluorescencia. Antisueros polyclonales fueron relatados como satisfactoriamente empleados para la mancha de punto y el diagnóstico del fitoplasma ELISA-basado sobre la FD en plantas infectadas y en *S. titanus* solo individuos tranquilos en viñedos

infectados por GY. Sin embargo, estos antisueros no cedieron resultados aceptables para la detección de agente de la FD en vid en el término de sensibilidad y especificidad. En *síntesis*, ningún instrumento serológico confiable está disponible hasta ahora para los test E.L.I.S.A., o métodos similares, en tejidos de vid.

5 En realidad, varios métodos para la detección de la FD han sido desarrollados; ellos incluyen métodos convencionales PCR/RFLP basados en el análisis de ribosomal y genes non-ribosomal (Lee al., 2004; Botti et al., 2007) y analisis más recientemente en tiempo real PCR (RT-PCR) (Bianco et al. 2004; Galetto et al. 2005; Angelini et al. 2007; Hren et al., 2007). Sin embargo, ninguno de estos análisis permiten fácilmente y prontamente distinguir la FD fitoplasma de otro fitoplasmas esporádicamente encontrados en la vid (EY = el olmo amarillo, ALY=alder amarillo), requieren mucho tiempo para el tratamiento de muestra (PCR/RFLP).

10 Varias secuencias de nucleótido relacionadas con "Ca. Phytoplasma vitis" están disponible en bases de datos en línea (16 rpl22, rps3, secY etc.) pero ninguno de ellos es conveniente para el diseño de un análisis RT PCR para la identificación específica de fitoplasma de la FD asociado. El único método actualmente disponible para únicamente identificar la FD consiste en un análisis diagnóstico molecular que comprende dos fases principales con varios pasos analíticos (Bianco et al., 2004).

15 Las fases principales pueden ser resumidas así: el ADN extraído de muestras de vid es sujeto a una primera amplificación génica (PCR el punto final) produciendo amplicons que posteriormente son usados para el segundo paso principal como plantilla para un análisis RT PCR . Detalladamente, dos diferentes grupos, como relatados por Lee et al., 1993 o por Deng y Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995, elaborados para la amplificación del ADN 16Sr de todos los fitoplasmas conocidos, son usados para una primera ronda de amplificación. Los amplicones son entonces sujetos a PCR anidado la utilización de cartillas diseñadas para la amplificación específica de ADN del áster yellows y el grupo stolbur (Davis et al., 1997), o cartillas diseñadas para la amplificación específica del grupo del olmo yellows (Lee et al., 1994).

20 Para desarrollar un análisis RT PCR para la detección simultánea de fitoplasmas que pertenece a los subgrupos 16SrV-C de 16SrV-d, unas cartillas específicas fueron diseñadas. El fragmento amplificado contiene el sitio de hendidura Bfal que está presente tanto en subgrupos de 16SrV-d como en el 16SrV-C. En el mismo fragmento una sola mutación base (la T en vez de C) ocurre en la posición 1068 de EY1 y tensiones de referencia de ULW así la interrupción del sitio de restricción Bfal (el Higo 1). La presencia de este sitio de restricción ha sido sugerida como un marcador distintivo para la identificación de fitoplasmas relacionados con los agentes de la FD (Lee et al., 1998) y recientemente adoptada en Italia para la identificación de fitoplasmas asociados con la FD (Pasquini et al., 2001).

25 La desventaja de esta metodología, que incluye dos reacciones de amplificación, consiste en el largo tiempo de ejecución y el alto coste. Además, la persona experta está bien consciente que varios pasos analíticos pueden implicar los riesgos de contaminación cruzada de muestras. Considerando el efecto "catastrófico" causado por la FD, los rizomas sin síntomas, la dificultad en la distinción de la FD de EY Y O ALY, y cultivars valioso que con severidad es afectado por esta enfermedad, es evidente que un método rápido y confiable para la detección de la enfermedad podría permitir la activación de programas de controles nacionales e internacionales, y podría favorecer medidas preventivas contra la extensión de la enfermedad en viveros, centros verdes, y lugares de cría.

30 Ningunos instrumentos curativos ni el tratamiento químico son hasta ahora eficaces contra el patógeno. Por esta razón, después de los brotes nuevos y destructivos certificados de la FD en los años 1990 en Francia, luego en Italia del norte y ahora en las áreas balcánicas, y desde cuando la FD está incluida en la lista de cuarentena de EPPO, varias iniciativas (p. ej. el Ministerio de agricultura italiano promulgó un decreto para el control obligatorio de la enfermedad, D.M. la n. 32442 del 31 de mayo de 2000: "Misura per la lotta obbligatoria contro la Flavescenza Dorata della vite", publicado en el G.U. La n 159 del 10 de julio de 2000) estableciendo oficialmente las medidas que tuvieron que ser cumplidas para contener las infecciones de la FD. Detalladamente, en aquellas áreas donde la FD está presente como focus, la extirpación de la enfermedad por la eliminación y la destrucción de la planta infectada es obligatoria. Además, también los tratamientos de insecticida dos veces por año contra *Scaphoideus titanus* Ball son obligatorios. Además, las medidas de control pueden ser impuestas por Servicios de Protección de Planta locales (PPS), según cada situación específica, incluyendo la extirpación completa de viñedos con plantas sintomáticas.

35 Los fitoplasmas asociados con los fitoplasmas dela vid Palatinate German yellows f (PGY) han sido relatados sólo una vez en la literatura y ningunos otros casos de esta infección han sido relatados después en la vid. Ellos parecen ser transmitidos por el aliso saltahoja. *Oncopsis alni* (Schrank) (Maixner, M., y la W. Reinert. 1999. Maixner, M., W. Reinert, y H. Darimont. 2000), y ellos fueron clasificados como los miembros del grupo 16SrV sobre la base de su gene 16 rRNA. Los fitoplasmas Palatinate Grapevine Yellows (PGY), generalmente ocurriendo en plantas non-vid, también fueron encontrados esporádicamente en la vid. PGY surgió como una nueva infección de vid yellows en los años 1990 en Alemania. En el viñedo, el vector puede inocular la vid por el dar de comer errático este anfitrión atípico. Correspondiente

al bajo riesgo de infección, PGY casi exclusivamente es encontrado en más bien viejos viñedos y con una incidencia baja (el 1 %), pero parece para ocurrir en cualquier parte donde la vid sea cultivada en la asociación cercana con árboles de aliso (Maixner et al., 2000). Hasta ahora, la transmisión experimental de PGY fitoplasmas por *S. titanus* especímenes ha permanecido fracasada (M. Maixner y E. Boudon-Padieu, resultados inéditos).

5

Es importante mirar la epidemiología de enfermedades causadas por fitoplasma que pertenece a 16SrV. Mientras el fitoplasma de la FD es fuertemente epidémico, y es reconocido por la Organización de Protección de Plantas europeas y mediterráneas (EPPO) como un parásito de cuarentena (EPPO/CABI, 2003), otros fitoplasmas del mismo subgrupo, como EY, PGY Y ALY, no son epidémicos. Ellos esporádicamente se encuentran en la vid, probablemente porque sus vectores dan ocasionalmente de comer a la vid y ellos no sobreviven bastante para adquirir el patógeno de la vid. Fuerzan a los cultivadores de vid, así, eliminar las plantas infectadas por fitoplasmas de la FD, mientras que es, ni obligatorio, ni necesario de destruir la planta infectada por EY, ALY y a veces otros fitoplasmas encontrados hasta ahora en la vid.

10

De ahí, debido a los tratamientos severos que sigue una infección de la FD (o una infección sospechada de FD) como la extirpación de plantas, tratamientos de insecticida, cuarentena y otros, y debido al hecho que cuando una infección de FD es, de verdad, presente ningún rizoma puede ser salvado y ninguna propagación de la vid es posible, mientras que, por vía del ejemplo, cuando está presente una infección ALY o EY las mismas medidas no tienen que para ser adoptadas, es evidente que una prueba diagnóstica y/o el instrumento que permite a una identificación inequívoca y específica de la presencia o de la ausencia de la FD en una infección fitoplasmática serían muy útiles y podrían evitar medidas drásticas y las pérdidas innecesarias de plantas de vid preciosas.

15

DESCRIPCIÓN

La presente descripción proporciona una nueva secuencia de nucleótido de la SEC ID el No. 5 la codificación para el gene *rpl14* (ribosomal la proteína 14 el gene) de fitoplasmas que pertenece al subgrupos 16SrV-C y de 16SrV-d en el que el grupo (16SrV) comprende al menos la infección fitoplasmas asociada con otras enfermedades como el Alder yellow (ALY), Elm Yellow (EY), Elm witch's broom (ULW) y FD, a veces encontrados en vid asintomáticas (también llamó la "Ca. phytoplasma vitis" aunque la nomenclatura para fitoplasmas sea todavía en la discusión en el mundo científico).

25

El gene *rpl14* cifra para el L14 ribosomal la proteína que, como se cree, ata los 23 rRNA entre los centros para peptidyl transferase y GTPASE. Detalladamente, el ribosomal peptidyl transferase el centro (PTC) reside en la subunidad grande ribosomal y cataliza las dos principales reacciones químicas de síntesis de proteína: formación de obligación de péptido y liberación de péptido. La liberación de péptido más fuerte debería depender de la catálisis química probablemente que implica un grupo rRNA del PTC. (Polacek, N. y Mankin, A.S, 2005).

30

La recién secuencia proporcionada permite para el reconocimiento de fitoplasmas diferentes que pertenecen a dichos subgrupos y proporciona un nuevo instrumento para una identificación específica de subgrupo de estos microorganismos.

35

La secuencia es revelada como la SEC ID el No. 5 y la proteína cifrada por la secuencia es revelada en la SEC ID el No. 6.

40

La SEC ID el No. 5 es casi idéntico para FD, ALY, EY Y ULW, sin embargo, ciertos nucleótidos definidos como "n" en el listado de secuencia y los aminoácidos relacionados definidos como "Xaa" en el listado de secuencia permiten a la distinción entre el fitoplasma que induce la FD en la vid y otros tres conocidos fitoplasmas perteneciendo a los mismos subgrupos de la FD, a saber ALY, EY y ULW.

45

La presente secuencia de ahí provee un instrumento útil para la detección específica de la presencia de fitoplasma relacionado con FD representado en la SEC ID el No. 1, y cifra para la proteína ribosomal *rpl14* específico para el fitoplasma asociado con FD que se diferencia para dos polimorfismos de nucleótido solo (SNPs) de otros fitoplasmas que pertenecen al grupo taxonómico 16SrV.

50

Esta secuencia es realizable como un instrumento diagnóstico como esto comprende dos SNPS específico para FD en la posición 108 y en la posición 171. Debido al SNPS identificado por los autores de la presente invención, es ahora posible, leyendo las enseñanzas de la presente descripción, diseñar un análisis diagnóstico que expresamente identifica el fitoplasma asociado con FD.

55

Como dicho aquí encima, el gene *rpl14* es caracterizado por dos SNPS en la posición 108 y 171 de la SEC ID el No. 1 que permite distinguir tensiones de fitoplasmas asociadas con FD de otros fitoplasmas (no asociados con FD) como el fitoplasmas asociados con EY Y ALY, ocasionalmente presentes en vid.

60

La presente descripción de ahí proporciona una secuencia de nucleótido de la SEC ID el No. 5 o la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5, una secuencia de nucleótido de la SEC ID el No. 1 o la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 1 o se fragmenta de eso, dichos fragmentos que comprenden un o ambos de nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 1, o de sus nucleótidos complementarios, o dichos fragmentos que ser(son) convenientes para la amplificación de un fragmento de la SEC ID el No. 1, o la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 1 la comprensión del que o ambos de nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 1, o de sus nucleótidos complementarios, en el que dijo la secuencia o sus fragmentos son específicos para las tensiones del fitoplasma de la planta asociadas con la enfermedad de vid Flavescence dorée, un nucleótido vector la comprensión de una secuencia de nucleótido de la SEC ID el No. 5 o la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5, una secuencia de nucleótido de la SEC ID el No. 1, o la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 1, o se fragmenta de eso, dichos fragmentos que comprenden un o ambos de nucleótidos 108 y 171 de SEC ID el No. 1, o de sus nucleótidos complementarios, un método para el diagnóstico de la enfermedad de vid Flavescence dorée comprensión del paso complementario a la SEC ID el No. 5, una secuencia de nucleótido de la SEC ID el No. 1, o la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 1, o fragmentos, dichos fragmentos que comprenden un o ambos de nucleótidos 108 y 171 de la la SEC ID el No. 1, o de sus nucleótidos complementarios, un método para el diagnóstico de la enfermedad de vid Flavescence dorée comprendiendo el paso de a) identificar un o ambos de los nucleótidos en posición 108 y 171 de la SEC ID el No. 5, o de sus nucleótidos complementarios en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 1, en una muestra de planta comprendiendo el líber en el que la presencia de un residuo C en posición 108 de la SEC ID el No. 5, o de un residuo de G en su posición complementaria de nucleótido en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5, y/o de un residuo de G en posición 171 de la SEC ID el No. 1, o de un residuo C en su posición complementaria de nucleótido en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 1, indica la presencia de al menos una de las tensiones de fitoplasma asociadas con la enfermedad de vid Flavescence dorée en la muestra, y un kit para el diagnóstico de la enfermedad de vid Flavescence dorée comprendiendo el reactivo para identificar un o ambos de los nucleótidos en la posición 108 y 171 de la SEC ID el No. 5, y o de sus nucleótidos complementarios en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5 en un líber de planta.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

La figura1 representa una alineación del gene rpl14 de tres tensiones de FD Y ALY, EY Y ULW (el último siendo una tensión de fitoplasma asociada con la elm witch's broom (olmo de escoba de bruja) identificada en árboles de olmo. Esto pertenece al grupo taxonómico 16SrV-A, ahora llamado "Ca. Phytoplasma ulmi"). La alineación claramente demuestra un SNP C/T en la posición 108 y un SNP G/A en la posición 171 cada permiso la identificación específica de fitoplasmas asociado con FD.

La figura 2 muestra un ejemplo de amplificación. Muestran el número de Ciclo a lo largo del Eje de abscisas y unidades de fluorescencia arbitrarias (en realidad estos son el aumento de pliegue sobre la fluorescencia de fondo) muestran sobre el Eje de ordenadas. Es posible observar que una amplificación señala sólo para la muestra de vid infectada por FD fitoplasma así como para el control positivo. Ninguna amplificación fue descubierta en el control negativo. Esto muestra que FD RT PCR el análisis era específico al fitoplasma FD.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS SECUENCIAS

SEC ID No. 1: gene rpl14 del fitoplasma FD asociado

```

45 atgattcaagtaatacccggtttaaagtagctgataatagtggtgctaaagaagttta 60
   gttattaatattcctggttcaagtaaaagacggttatgctcaaataggcgatgttgtta 120
   gtcgctatataaaaaagattccatctggaatggtaaaaatcaggagaaaaagtctaaagct 180
   ttaattttacgtactaaaaaaggcttagcaggaaaaaatggttcttataaatttgat 240
   gataacgcagtagttattatcaaagatgatatgactttaaaagggacaaggattttgga 300
50 cctgtagtataaaaactaaaactaaaagatagtaaatcttcttcttagct 360
   gaaaaagttttgtaatatga 381.

```

Nucleótidos no. 108 y 171 subrayados y en negrilla corresponden al SNP de interés. Subrayados, de nucleótido 72 a 97 la cartilla avanzada de la SEC ID el No 2 debajo SEC ID No. 2:

tctggttcaagtaaaagacgttatg
del nucleótido 102 a 119 la cartilla anidada de la SEC ID el No. 3 debajo

SEC ID No. 3

aataggcgatgtgttg

y de nucleótido 147 a 171 la secuencia complementaria a la cartilla inversa de la SEC ID el No. 4 debajo:

SEC ID No. 4:

5

Cttttctcctgattttaccattcca

SEC ID No. 5: subgrupos 16SrV-C y gene rpl14 del fitoplasma 16SrV-D

10 atg att caa nta aat ann cgt tta aaa gta gct gat aat agt ggt gct 48
 aaa gaa gtt tta gtt att aat att cct ggt tca agt aaa aga cgt tat 96
 gct caa ata ggn gat gtt gtt gta gtc gct att aaa aaa agt att cca 144
 tct gga atg gtn aaa tca gga gaa aan tct aaa gct tta att tta cgt 192
 act aaa aaa ggc tta gca gga aaa aat ggt tct tat att aaa ttt gat 240
 15 gat aan gca gta gtt att atn aaa gat gat atg act tta aaa ggg aca 288
 agg att ttn gga cct gta gtt aaa aat caa aaa cta aaa gat agt aaa 336
 ttt tct aaa ttt ctt tct tta gct gaa aaa gtt ttt gta ata tga 381

20 en el que la n en la posición 10 es la G o A, la n en la posición 17 es C o G, la n en la posición 18 es C o T, la n en la posición 108 es C o T, la n en la posición 156 es un o la G, la n en la posición 171 es la G o A, la n en la posición 246 es C o T, la n en la posición 261 es C o T, la n en la posición 297 es C o T

SEC ID No 6: Subgroups 16SrV-C y del fitoplasma 16SrV-D la proteína ribosómica L14

25 Met Ile Gln Xaa Asn Xaa Arg Leu Lys Val Ala Asp Asn Ser Gly Ala
 Lys Glu Val Leu Val Ile Asn Ile Pro Gly Ser Ser Lys Arg Arg Tyr
 Ala Gln Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Ile Lys Lys Ser Ile Pro
 Ser Gly Met Val Lys Ser Gly Glu Xaa Ser Lys Ala Leu Ile Leu Arg
 Thr Lys Lys Gly Leu Ala Gly Lys Asn Gly Ser Tyr Ile Lys Phe Asp
 Asp Xaa Ala Val Val Ile Xaa Lys Asp Asp Met Thr Leu Lys Gly Thr
 30 Arg Ile Xaa Gly Pro Val Val Lys Asn Gln Lys Leu Lys Asp Ser Lys
 Phe Ser Lys Phe Leu Ser Leu Ala Glu Lys Val Phe Val Ile

35 En el que 'Xaa' en la posición 4 significa Ile, Val, o Leu., 'Xaa' en la posición6 significa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, o Encontrado, 'Xaa' en la posición57 significa Lys, o Asn, 'Xaa' en la posición 82 significa Lys, o Asn, 'Xaa' en la posición 87 significa Ile, o Encontrado, 'Xaa' en la posición 99 significa Leu, o Phe.
 SEC ID No 7: FD tensión asociada a la proteína ribosomal L14

40 Met Ile Gln Val Asn Thr Arg Leu Lys Val Ala Asp Asn Ser Gly Ala
 Lys Glu Val Leu Val Ile Asn Ile Pro Gly Ser Ser Lys Arg Arg Tyr
 Ala Gln Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Ile Lys Lys Ser Ile Pro
 Ser Gly Met Val Lys Ser Gly Glu Lys Ser Lys Ala Leu Ile Leu Arg
 Thr Lys Lys Gly Leu Ala Gly Lys Asn Gly Ser Tyr Ile Lys Phe Asp
 Asp Asn Ala Val Val Ile Ile Lys Asp Asp Met Thr Leu Lys Gly Thr
 Arg Ile Phe Gly Pro Val Val Lys Asn Gln Lys Leu Lys Asp Ser Lys

45

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los objetos de la invención son:

50 1. Un método para el diagnóstico de la enfermedad de vid Flavescence dorée comprendiendo el paso de:

a) identificación del que o ambos de los nucleótidos en posición 108 y 171 de la SEC ID el No. 5, y/o sus nucleótidos complementarios en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5, en una muestra de planta comprendiendo el líber;

55

en el que la presencia de un residuo C en la posición 108 de la SEC ID el No. 5, y/o de un residuo de G en su nucleótido complementario en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5 y/o de un residuo de G en la posición 171 de SEC. ID el No. 5, y/o de un residuo C en su nucleótido complementario, indica la presencia de al menos una de las tensiones de fitoplasma asociadas con la enfermedad de vid Flavescence dorée en la muestra.

60

2. El método del punto 1 en el que la identificación de paso:

- 5 a) comprende un primer paso en el que un PCR, PCR en tiempo real, Ligation, Allele la Hibridación Específica, la extensión de cartilla, la hendidura invasiva o la reacción secuencial son realizadas, y un segundo paso en el que el producto obtenido en el primer paso es descubierto por supervisando la luz emitida por el producto dicho, o midiendo la masa de productos dichos, o supervisando la radiactividad emitida por el producto dicho, o por secuencialidad del dicho producto.
- 10 3. El método de cualesquiera de puntos 1 o 2 en el que la dicha supervisión de la ligera emisión de luz es realizada supervisando la fluorescencia, la luminescencia, el tiempo la fluorescencia resuelta, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, o la fluorescencia polarizada, para medir la masa se ha utilizado la espectrometría de masas o el análisis heteroduplex, y supervisado la radiactividad con la radiactividad instrumentos sensibles.
- 15 4. El método de cualquiera de los puntos 1-3 en el que dijo que el método es realizado sobre el formato de fase sólido como la microserie o la microplaca.
- 20 5. El método de cualquiera de los puntos 1-3 en el que la dicha identificación es realizada con un RT PCR utilizando una cartilla avanzada de SEC ID el No. 2, una sonda allele específica de SEC ID el No. 3 y una cartilla inversa de SEC ID el No. 4.
- 25 6. Un kit para el diagnóstico de la enfermedad de vid Flavescence dorée comprendiendo el reactivo para la identificación de los nucleótidos en posición 108 y 171 de SEC ID el No. 5 o 1 y/o de sus nucleótidos complementarios en la secuencia complementaria a SEC ID el No. 5 o 1 en un líber de planta de vid.
- 30 7. El kit de la reclamación 6 más lejós que comprende apoyos sólidos en el que oligonucleotides para la identificación de un o ambos de los nucleótidos en la posición 108 y 171 de SEC ID el No. 5 o 1 y/o un o ambos de su de su nucleótido complementario en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5 o 1 es anclado en posiciones conocidas sobre el dicho apoyo en una o varia copia por posición.
- 35 8. El kit del punto 7 etiquetó pruebas y/o la correspondencia de oligonucleotides y/o complementario a una región corriente arriba y/o río abajo de un o ambos de los nucleótidos en la posición 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 o 1 y/o la superposición de una región que comprende un o ambos de los nucleótidos en la posición 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 o 1.
- 40 9. El kit de punto 8 en el que son etiquetados una o varias de las dichas sondas y/o oligonucleotides.
- 45 10. Una secuencia de nucleótido de la SEC ID el No. 1, dijo que la codificación de secuencia para el gene rpl14 (381bp) específico para el fitoplasma relacionado con FD.
- 50 La presente descripción proporciona una secuencia de nucleótido de la SEC ID el No. 5 o la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5 codificando para el gene rpl14 de fitoplasmas que pertenece a subgrupos de 16SrV-d y el 16SrV-C.
- 55 La descripción proporciona también una secuencia de nucleótido de la SEC ID el No. 5 o la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5 o se fragmenta de eso, los dichos fragmentos que comprenden un o ambos de nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 o de sus nucleótidos complementarios, o los dichos fragmentos que son convenientes para la amplificación de un fragmento de la SEC ID el No. 5 o la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5 comprendiendo un o ambos de nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 o de sus nucleótidos complementarios.
- La presencia de una C en la posición 108 de la SEC ID el No. 5 (o de una G en la posición correspondiente en el hilo complementario) y/o de una G en la posición 171 de la SEC ID el No. 5 (o de un C en la posición correspondiente del hilo complementario) en la SEC ID el No. 5 es específica para el fitoplasma asociado con la enfermedad de vid FD.
- La presente descripción también proporciona una secuencia de aminoácido de la SEC ID el No. 6 codificacando la proteína ribosomal L14 de fitoplasmas que pertenecen al 16SrV-C y subgrupos de 16SrV-d, y una secuencia de aminoácido de la SEC ID el No. 7 de la codificación para la proteína ribosomal L14 del fitoplasma asociado con FD.
- 60 La presente descripción proporciona una secuencia de nucleótido de la SEC ID el No. 1 o la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 1 o fragmentos, dichos fragmentos que comprenden un o ambos de nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 1 o de sus nucleótidos complementarios, o dichos fragmentos que son convenientes para la amplificación de un fragmento de la SEC ID el No. 1 o la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 1 comprendo un o ambos de

nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 1 o de sus nucleótidos complementarios, en el que la dicha secuencia o fragmentos son específicos para las tensiones del fitoplasma de la planta asociadas con la enfermedad de vid FD.

5 La secuencia, permitiendo expresamente descubrir las tensiones del fitoplasma de la planta asociadas con la enfermedad de vid FD puede ser la SEC ID el No. 1 o la secuencia complementaria, y los fragmentos pueden ser los fragmentos de la SEC ID el No. 1 o los fragmentos de la secuencia complementaria facilitan la comprensión de un o ambos de nucleótidos 108 de la SEC ID el No. 1 (un nucleótido C o esto es el complemento de G en el caso de un fragmento de la secuencia complementaria) y 171 (un nucleótido de G o esto es el complemento de C en el caso de un fragmento de la secuencia complementaria) o que ellos pueden ser usados para amplificar un fragmento de la SEC ID el 10 No. 1 comprendiendo un o ambos de los dichos nucleótidos.

15 Como se ha dicho, particulares nucleótidos representan SNPS que da la SEC ID No. 1 específico para las tensiones del fitoplasma de la planta asociadas con la enfermedad de vid Flavescence dorée y permite, solo o en la combinación con el otro, una distinción entre el dicho fitoplasma y fitoplasmas sumamente similar, perteneciendo al mismo grupo taxonómico, que no es asociado con FD.

20 Los fragmentos deberían ser los fragmentos de una dimensión conveniente de ser usado para la detección de las tensiones de fitoplasma asociadas con la enfermedad de vid FD con cualquier técnica común conocida para la detección SNPS en el arte.

Normalmente, la persona experta conocería el tamaño conveniente para los fragmentos que podrían ser aproximadamente de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200 nucleótidos en la secuencia llena en caso de sequencing completo del gene para la identificación del fitoplasma relacionado con FD.

25 Los fragmentos de la presente descripción pueden ser usados como pruebas para PCR, como pruebas para la detección de microserie de SNPS, o pueden ser los productos de las técnicas usadas para identificar SNPS. De ahí, según la técnica usada en un método para la identificación de un o ambos los nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 5, los fragmentos pueden ser ascendentes o descendentes en lo que concierne al nucleótido 108 y/o el nucleótido 171 de la SEC ID el No. 5, o puede ser fragmentos que comprenden uno de los nucleótidos ya mencionados o ambos de los ya 30 mencionados nucleótidos.

35 La persona experta está bien consciente que, cuando la detección de un SNP está implicada, la identificación del nucleótido(s) de interés puede ser continuada el uno o el otro hilo de la secuencia de nucleótido, de ahí, los fragmentos de la invención pueden ser diseñados para identificar un o ambos de los nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 o 1, y/o identificar un o ambos de los nucleótidos complementarios a los nucleótidos 108 y 171 de la secuencia de nucleótido complementaria a la SEC ID el No. 5 o 1 que implícitamente es revelada por el descubrimiento de la SEC ID el No. 5 o 1.

40 La descripción siguiente clarificará más detalladamente los fragmentos de la invención, todos siendo caracterizados por el hecho que pueden ser usados para la identificación de SNPS ya mencionados. La SEC ID el No. 5 es específica del grupo de fitoplasmas para la comprensión de los fitoplasmas que causan FD, ALY, EY y ULW. De otra parte, la secuencia de nucleótido de la SEC ID el No. 1 o fragmentos aquí revelados son específicos para ambas las tensiones del fitoplasma asociadas con FD conocidas en el arte, p. ej. tensiones asociadas a FD que pertenecen al grupo taxonómico 16SrVD así como tensiones que causan la FD y pertenecen al grupo taxonómico 16SrVC.

45 De ahí, la SEC ID el No. 1 representa una de las encarnaciones posibles de la SEC ID el No. 5, en particular la encarnación en el que el nucleótido 108 es C y el nucleótido 171 es G.

50 Como ya indicado en la presente especificación, la secuencia o sus fragmentos aquí descritos son aplicables como instrumentos diagnósticos para la identificación, en una muestra de vid, del fitoplasma asociado a la enfermedad de vid Flavescence dorée.

55 La descripción también proporciona vectores como por ejemplo vectores de clonación o vectores de expresión comprendiendo una secuencia de nucleótidos de SECID el No. 5 o de la SEC ID el No. 1 o fragmentos, dichos fragmentos que comprenden un o ambos de nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 o 1.

60 El vector puede ser usado como un control positivo o negativo en un método diagnóstico para la detección de fitoplasmas asociados a FD en una muestra de líber de vid según los nucleótidos en posición 108 y 171 (C y G, respectivamente, proporcionarán un control positivo si otros nucleótidos proporcionarán un control negativo) o esto también podría ser usado como un instrumento de investigación para el desarrollo de anticuerpos y/o para el estudio de terapias posibles para curar la enfermedad de la planta.

Un objeto de invención es un método para el diagnóstico de la enfermedad de vid Flavescence dorée comprendiendo el paso de:

5 a) la identificación de uno o ambos los nucleótidos en posición 108 y 171 de la SEC ID el No. 5, y/o de un o ambos sus nucleótidos complementarios en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5, en una muestra de planta de vid comprendiendo el líber en el que la presencia de un residuo C en posición 108 de la SEC ID el No. 5 y/o de un residuo de G en su nucleótido complementario en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5 y/o de un residuo de G en la posición 171 de la SEC ID el No. 5 y / o de un residuo C en su nucleótido complementario en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5, indica la presencia de al menos una de las tensiones del fitoplasma asociadas con la enfermedad de vid Flavescence dorée en la muestra.

15 Según la presente descripción, la frase "...su nucleótido complementario en la secuencia complementaria a la SEC ID No.." también puede ser definida con el significado de "su complemento" de la posición complementaria en lo que concierne a una posición de nucleótido en la secuencia de referencia, en la secuencia complementaria a la secuencia de referencia, de ahí, donde la frase "... su nucleótido complementario en la secuencia complementaria a la SEC ID No... " o "el nucleótido N en la posición en la secuencia complementaria correspondiente a la SEC ID No.." donde la N puede ser cualquier nucleótido o una frase similar que quiere decir el mismo con una expresión ligeramente diferente puede ser substituida según los términos "su o el complemento".

20 La muestra según la presente descripción puede ser alguna prueba fácil de conseguir de una planta de vid, con tal de que la muestra comprenda el líber de la planta debido a la presencia de los fitoplasmas siendo limitado con este fluido de la planta.

25 La persona experta sabría obtener tal muestra; cuando la muestra es tomada de una planta es posible obtener el fluido directamente de las venas de la hoja. Las muestras de líber están también disponibles de la vid retoños o de las frutas o de las semillas o del rizoma. Los protocolos para la colección de muestras que comprenden líber están disponibles a la persona experta sin la necesidad de remotos detalles en la presente descripción (Pasquini et. Al-, 2001).

30 En el método de la invención el líber fácil de conseguir con los métodos estándar de la muestra puede ser usado como tal, o una extracción de los totales ácidos nucleicos (TNA) puede ser realizada con métodos estándar (por vía del ejemplo el método descrito en Angelini, et al. 2001 Flavescence dorée in France and Italy: occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. Vitis 40:79–86. (Page 80 column 2), o por Šeruga Musič et al. 2008, pag. 121.

35 La identificación de un o ambos de los nucleótidos en posición 108 y 171 de la SEC ID No. 5 (y/o de uno o varios de sus nucleótidos complementarios en la secuencia complementaria a la SEC ID No. 5) puede ser realizado con cualquier técnica conocida conveniente para la detección de un SNP conocido, la presencia de nucleótido C en posición 108 de la SEC ID el No. 5 y/o del nucleótido G en la posición correspondiente en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5 y / o de nucleótido G en posición 171 de SEC ID el No. 5 y/o del nucleótido C en la posición correspondiente en la secuencia complementaria a SEC ID el No. 5, indica la presencia en la muestra del fitoplasma asociados con la enfermedad de vid FD.

45 A modo de ejemplo, la identificación del paso a) puede comprender un primer paso de amplificación PCR de uno o varios fragmentos que comprende un o ambos del SNPS de interés y un análisis subsecuente del fragmento(s) amplificado por evaluando la masa del fragmento(s) amplificado y de ahí definiendo la base de pares presente en la posición de interés o simplemente por la secuenciación del fragmento(s) o usando el fragmento(s) amplificado para otras técnicas de detección como algunas técnicas ejemplificadas debajo.

50 Si ambos SNPS son amplificados cada uno en un fragmento diferente, un tamaño de amplicon diferente puede ser seleccionado para los dos fragmentos para facilitar la detección.

55 En una encarnación de la invención, el paso de identificación a) puede comprender un primer paso en el que son realizadas: PCR en tiempo real (también RT-PCR), Ligation, Allele la Hibridación Específica, la extensión de cartilla, la hendidura invasiva o la reacción secuencial; y un segundo paso en el que el producto obtenido en el primer paso es descubierto por supervisando la luz emitida por el dicho producto, por midiendo la masa de los dichos productos, por supervisando la radiactividad emitida por el dicho producto, y/o por secuenciar el dicho producto.

60 Será fácilmente entendido por la persona experta que cualquier otro protocolo conveniente y técnica conocida para la identificación de un SNP en una secuencia del nucleótido pueden ser aplicados al método aquí descrito.

Varias técnicas para la identificación de SNPS conocidas en el arte y convenientes para realizar el método diagnóstico aquí descrito son resumidas en 2001 Kwok.

- 5 Se conocen numerosas técnicas en el arte para la identificación de un dado SNP en un ácido nucleico, varios de ellos son aplicables a una tecnología de apoyo sólida como microtítulos o microseries o chips y son así convenientes para la selección de un alto número de muestras. Cuando una selección debe ser realizada en un viñedo o en un vivero de vid, es conveniente utilizar métodos para la detección del SNP de interés que son fácilmente aplicables a un grande cantidad de muestras.
- 10 Cuando es usado RT PCR, es posible aplicar el protocolo clásico RT PCR disponible en los manuales RT PCR y en protocolos de laboratorio. Los métodos solían verificar que la identidad del amplicon(s) producido en PCR en tiempo real es suficientemente poderosa de descubrir pequeñas variaciones entre las secuencias. Las variaciones en la secuencia, incluyendo polimorfismos de nucleótido solos (SNPs) satisfactoriamente han sido identificadas en los análisis RT PCR. Un método común para la detección de variación de secuencia es de comparar las curvas que se derriten. En general, el efecto de sustituciones bajas sobre la cinética que se derrite de productos PCR es demasiado pequeño para ser descubierto por fuentes fidedignas; sin embargo, heteroduplexes de relativamente mucho tiempo amplicons el diferir por un SNP pueden ser distinguidos de los homoduplexes sobre la base de sus curvas de fusión.
- 15 Las curvas que se derriten de cortas sondas fluorescentes pueden ser usadas para distinguirse entre amplicons. Este método es sensible a SNPs, que por lo general causan un movimiento en el pico que se derrite de varios grados. El diseño de cartillas convenientes para RT-PCR es fácilmente logable con programas convenientes disponibles a la persona experta (un par de cartilla posible es representado en la SEC ID el No. 2 y 4) y el descubrimiento de la SEC ID el No. 1 y de la SEC ID el No. 5 y del SNP de interés a la posición 108 del mismo, es suficiente para la persona experta para fácilmente diseñar el análisis RT PCR sin el empleo de habilidad inventiva o experimentación incómoda. El mismo solicita la detección del SNP de interés a la posición 171 o de ambos SNPS.
- 20 La persona experta fácilmente diseñará cartillas y oligonucleotides para la amplificación y la detección del SNP en la posición 171 o para la amplificación y la detección de un fragmento que comprende ambos los SNPS.
- 30 PCR en tiempo real puede implicar el empleo de sondas fluorescentemente etiquetadas como ácidos nucleicos o cartillas, o tintes fluorescentes obligatorios de ADN como por ejemplo SYBR® Verde y otros mencionados en la presente descripción, descubrir y cuantificar un producto PCR en cada ciclo durante la amplificación. Si deseado, diferentes tintes fluorescentes pueden ser usados para diferentes SNPs.
- 35 De ahí, según la presente descripción, el producto(s) amplificado o las pruebas pueden ser etiquetados por un fluoróforos después de las instrucciones del fabricante cuando es analizada la curva de cortas sondas fluorescentes.
- 40 Muchos accesos RT PCR emplean a dos diferentes reporteros fluorescentes y confían en la transferencia de energía de un reportero (el donante de energía) a un segundo reportero (el aceptador de energía) cuando los reporteros están en la proximidad cercana. El segundo reportero puede ser un quencher o un fluor. Un quencher absorberá la energía del primer reportero y lo emitirá como el calor más bien que la luz, conduciendo a una disminución en la señal fluorescente.
- 45 Un fluor absorberá la energía y lo emitirá en otra longitud de la onda por la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (en inglés FRET), causando la fluorescencia disminuida del donante de energía y la fluorescencia aumentada del aceptador de energía. El cambio de la fluorescencia es proporcional a la acumulación de producto PCR. Una común alternativa al método de la curva que se derrite debe usar las sondas de hidrólisis (como TaqMan). Las sondas de hidrólisis son etiquetadas por un tinte fluorescente al 5'-final y un quencher al 3'-final, y porque los dos reporteros están en la proximidad cercana, la señal fluorescente es apagada. Durante el paso de templadura, la sonda hibrida al producto PCR sintetizado en ciclos de amplificación anteriores.
- 50 La resultante prueba: el híbrido objetivo es un sustrato para los 5'→3' exonucleasa la actividad de polimerasis de ADN Taq, que degrada la prueba templada (3) y libera el fluor. El fluor es liberado de los efectos del quencher, y de los aumentos de fluorescencia. En una encarnación la identificación del SNP de interés puede ser realizada por RT PCR utilizando pares de cartilla convenientes y una prueba de oligonucleotide conveniente allele específica (la sonda TaqMan®), p.ej. una prueba MGB (en inglés Minor Groove Binding). El allele-específico "sonda TaqMan" puede ser diseñado basándose en la información SNP descrita encima. La fin 5' de la sonda TaqMan es etiquetada por el reportero de fluorescencia tiñen R (p.ej. FAM o VIC), y al mismo tiempo, el final 3' es etiquetado por el quencher Q (apagando la sustancia).
- 55

Así, en estas condiciones, la fluorescencia no es perceptible ya que el quencher absorbe la energía de la fluorescencia. Ya que el final 3' de la sonda TaqMan® es fosforilado, ninguna reacción de extensión ocurre de la sonda TaqMan durante la reacción PCR.

- 5 En una encarnación de la invención, las sondas TaqMan® MGB pueden ser etiquetadas por 6-carboxyfluorescein (FAM) en el final 5' y con quencher no fluorescente (NFQ) con la carpeta de surco menor (MGB) en el final 3'.

Las sondas MGB en la presente invención reveló una temperatura más alta que se derrite (T_m) y aumentó la especificidad y eran sondas MGB era una secuencia más específica que las sondas ADN estándar, sobre todo para cada desajustes de base en temperaturas de hibridación elevadas.

10 Todas las reacciones RT PCR pueden ser realizadas sobre un ABI PRISM® 7300 Sistema de Detección de Secuencia (Biosystems Aplicado) en 96 platos ópticos con cubiertas ópticas adhesivas (ambos Biosystems Aplicados) la utilización de las condiciones de ciclismo siguientes: 10 minuto en 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 a 95°C y 1 minuto en 61,5°C, que permitió a la carrera de todas las reacciones sobre el mismo plato. RT PCR puede ser realizado en un volumen de reacción final de 25 μ L que contiene 5 μ L de ADN de la muestra, 300 cartillas nm, 250 nm de la sonda y 1 \times TaqMan® la Mezcla principal Universal PCR (Biosystems Aplicado), que incluye ROX como un tinte de referencia pasivo.

15 Cartillas y sondas convenientes pueden ser diseñadas con varios algoritmos y los programas disponibles también en Internet, o su estilo puede ser comisionado vía servicios disponibles en comercio. En una manera no limitativa, sondas convenientes podrían ser una cartilla avanzada de 26 nucleótidos en la longitud que comienza en posición 72 de 5' a 3' de la SEC ID el No. 5, a condición de que aquí como la SEC ID el No. 2, una sonda TaqMan® de 17 nucleótidos en la longitud que comienza en la posición 102 de 5' a 3' de la SEC ID el No. 1, a condición de que aquí como la SEC ID el No. 3 etiquetara p.ej. por 6-FAM en el final 5', y una cartilla inversa de 25 nucleótidos en la longitud que comienza en la posición 147 de 5' a 3' de la SEC ID el No. 1, como la SEC ID el No. 4. Cuando una sonda TaqMan® es usada, el SNP (C/T) de interés es localizado en el centro en la dicha sonda.

20 Cuando en este análisis es usada la SEC ID NÚMEROS 2-4, la temperatura de templadura conveniente es de aproximadamente 61-61,5 °C. Los análisis que usan TaqMan® son conocidos en el arte y a la persona experta están disponible protocolos llenos, en principio. El análisis de discriminación allelica nucleasa 5', o el análisis TaqMan, es un análisis basado sobre el PCR para el genotipo SNPs. La región flanking el SNP es amplificada en la presencia de dos sondas allele-específicas fluorescentes. Las sondas no hacen fluoresce en la solución debido a un quencher en final 3'. La presencia de dos sondas permite la detección de ambos allelees en un tubo solo. Además, porque las sondas son incluidas en el PCR, el genotipo es determinado sin cualquier tratamiento de post-PCR.

25 Las técnicas convenientes para realizar el método aquí revelado comprenden también Hibridación Específica Allele también conocida como ASO (en inglés Allele Specific Oligonucleotide, o sea hibridación específica allele oligonucleotide).

30 Este protocolo confía en la distinción entre dos moléculas de ADN que se diferencian por una base (es decir el SNP de interés) por la hibridación. El TNA obtenido por la muestra de liber es amplificado con cartillas convenientes PCR diseñadas para amplificar una región de la SEC ID el No. 5 comprendiendo un o ambos de los nucleótidos 108 y 171, en una encarnación conveniente, el PCR amplicons es la fluorescencia etiquetada. Los fragmentos obtenidos por PCR son que aplicado a inmovilizado oligonucleotide los fragmentos de la SEC ID el No. 1 comprendiendo el SNP o los SNPs de interés. Después de la hibridación conveniente y de las condiciones lavadoras, la intensidad de fluorescencia es medida para cada oligonucleide.

35 Debido al hecho que es analizado un SNP, la hibridación rigurosa y las condiciones lavadoras tendrán que ser usadas, donde por riguroso la persona experta entenderá las condiciones que permitirán sólo al 100 % de las secuencias híbridas correspondientes para permanecer en la doble forma de hilo. El medio típico para regular la severidad de un protocolo híbrido es la concentración de sal (más alta es la concentración y más baja es la severidad) y/o la concentración formamide (más alta es la % y más alta es la severidad) y/o la temperatura (más alta es la temperatura y más alta es la severidad). Se conocen condiciones de severidad convenientes para la identificación de SNPs por RT-PCR en el arte y protocolos estándar publicados para esta reacción.

40 Este tipo de identificación puede ser realizado también en una fase sólida, p. ej. sobre un apoyo sólido (definido sucesivamente) como el microtítulo, el chip de microserie y similares, permitiendo a la selección de un grande número de muestras.

45 En una encarnación particular, las microseries serán usadas. La diapositiva de microserie es un instrumento diagnóstico muy poderoso capaz de identificarse, en un experimento solo, la presencia/ausencia de un alto número de objetivos. Los

- chips aprovechan una importante propiedad de ADN, que es la pareja de bases complementarias (la pareja T con A y la pareja G con C) en su estructura. La técnica diagnóstica consiste en una señal luminosa (emitida por un fluóforo en longitudes de ondas diferentes) en la correspondencia a la hibridación entre el fragmento objetivo etiquetado por el fluóforo y la correspondiente sonda atado a la diapositiva de microserie. Esta encuadernación, con la subsecuente ligera emisión de luz, muestra que en el grupo de sondas analizadas un fragmento de ADN complementario a la sonda que es "alumbrada" está presente y, por consiguiente, permite conocer la identidad del fragmento objetivo.
- Hay varias técnicas conocidas para etiquetar el ácido nucleico analizado (directo, indirecto) por la creación de eslabón con la emisión de fluóforos que emiten la luz en longitudes de onda diferentes (por lo general en rojo y en verde). La sonda sobre la diapositiva de microserie no está destinada alfluóforo, por lo tanto la diapositiva de microserie que no es híbrida, cuando observado bajo un escáner confocal no muestra ninguna señal luminosa.
- Antes de la hibrisación sobre la microserie una amplificación PCR del ADN meta, es realizada para aumentar tanto la cantidad de ADN meta que va a fácil la detección de la señal, y para etiquetar el ADN meta para la detección sobre la microserie. El etiquetaje puede ser realizado con cualquier molécula de etiquetaje comúnmente usada para la detección de microseries.
- Sobre la variedad, aunque una copia sólo pudiera ser descubierta sobre el chip, preferentemente varias copias de la sonda que comprende un fragmento de la SEC ID el No. 5 en el que C está presente en la posición correspondiente a la posición 108 de la SEC ID el No. 1 (y/o G está presente en la posición correspondiente a la posición 108 la SEC ID el No. 5 en la secuencia complementaria a SEC ID el No. 5) y/o en el que G está presente en la posición correspondiente a la posición 171 de la SEC ID el No. 5 (y/o C está presente en la posición correspondiente a la posición 171 la SEC ID el No. 5 en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5) (p. ej. los fragmentos correspondientes de la SEC ID el No. 1), puede ser colocado por punto para aumentar la señal sobre la microserie cuando el fitoplasma asociado a FD está presente en la muestra analizada y amplificada.
- La reacción de amplificación PCR por lo general requiere el empleo de pares de cartilla específicos para la amplificación de las regiones diferentes de la secuencia de interés.
- Es evidente que la región amplificada tendrá que comprender el nucleótido correspondiente a un o ambos de los nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 (o un o ambos de los nucleótidos complementarios al nucleótido 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5) p. ej. las posiciones de la discriminación SNPs, en el amplicon(s)
- En la presente descripción, los fragmentos que comprenden el nucleótido correspondiente al nucleótido 107 de la SEC ID el No. 1 (o el nucleótido complementario al nucleótido 107 de la SEC ID el No. 1 en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 1) son fragmentos en el que los nucleótidos ascendentes y descendentes en la SEC ID el No. 1 o en su secuencia complementaria cuando es considerado el nucleótido complementario al nucleótido 107.
- Es perfectamente entendido que está presente una alineación del 100 % entre la SEC ID el No. 5 o la SEC ID el No. 1 (o su secuencia complementaria) y su fragmento según la presente descripción.
- El diseño de las cartillas para la amplificación puede ser realizado con cualquier programa conveniente disponible a la persona experta (no hay límites de ejemplos: Primer Premier, que puede ser usado para diseñar cartillas para plantillas solas, alineaciones, el diseño de cartilla degenerado, el análisis de enzima de restricción, contig el análisis y el diseño de cartillas sequencing; AlleleID y el Beacon Designer puede diseñar cartillas y sondas de oligonucleotide para análisis de detección compleja como análisis múltiples, el diseño de cartilla de especie cruzada, la especie del diseño de cartilla específico para reducir el coste de experimentación; PrimerPlex es un software que puede diseñar ASPE (en inglés Allele Specific Primer Extension, o sea Allele la Extensión de Cartilla Específica) cartillas y capturar sondas para SNP múltiple genotipos utilizando sistemas de serie de suspensión como Luminex xMAP® y BioRad Bioplex, el Expreso de Cartilla) o por servicios disponibles en el comercio para el diseño de oligo.
- El comienzo de la SEC ID el No. 1 o 5 aquí revelado sabiendo que el fragmento para ser híbrido sobre la microserie tendrá que comprender un o ambos de nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 1 o 5, la persona experta fácilmente sabrá proporcionar cartillas convenientes para la amplificación. Un hilo del nucleótido complementario a la secuencia amplificada será manchado sobre la microserie para hibridación subsecuente. Sobre la microserie, los fragmentos de control pueden ser manchados para verificar la eficacia del método usado.
- En todos los métodos para realizar la identificación del SNPS, cuando la SEC ID el No. 5 es mencionada es evidente que los mismos métodos aplican automáticamente para aquellas encarnaciones a la SEC ID el No. 1 como la SEC ID el No. 1 es comprendida en la SEC ID el No. 5. La persona experta de ahí puede leer la SEC ID el No. 5 en vez de la SEC ID el

No. 1 para todas las encarnaciones de esta especificación que se relacionan con la identificación de fitoplasma asociado con FD.

5 Cartillas convenientes para la amplificación del fragmento que comprende el SNP en la posición 108 para ser híbrido sobre la serie son también las cartillas que tienen la SEC ID el No. 2 y la SEC ID el No. 4 aquí previsto como la ejemplificación de cartillas.

10 El diseño de cartillas para la amplificación de un fragmento que comprende el SNP en la posición 171 es fácilmente lográble para la persona experta que comienza de la SEC ID No. 5 o 1 así como el diseño de cartillas para la amplificación de un fragmento que comprende a ambos el SNPS de interés.

15 Las condiciones de hibridación para la técnica allele específica de hibridación están disponibles en el arte; un ejemplo de condiciones convenientes puede ser 16 horas de hibridación a 48°C (el 25 % de formamide). Por ejemplo, la microserie de hibridación podría ser realizada después de un protocolo estándar así, en el que algún paso puede ser omitido, modificado o añadido por la persona experta sin el empleo de habilidad inventiva:

La hibridación de microserie y lava a condiciones:

20 Prehybridisation:

25 1. Prehybridisation buffer: 5x SSC, el 0.1 % SDS y el 1 % BSA. Calor a aproximadamente 50 ° C revolviendo; 2. Las diapositivas para ser analizadas son colocadas en un tarro que se mancha; se añade el prehybridisation buffer, y la incubación es realizada en aproximadamente 48 ° C durante 45-60 minuto revolviendo; 3. Las diapositivas son lavadas por bajando arriba y abajo de aproximadamente 10 veces en dos diferentes tarros de manchar de agua deionizada. El agua de exceso es quitada por sacudiendo el estante de diapositiva arriba y abajo de dos veces; 4. Entonces bañan las diapositivas en un arriba y abajo hacen señas aproximadamente 10 veces en la temperatura ambiente en el isopropanol e hizo girar secado. Las diapositivas son usadas inmediatamente después la prehybridisation (menos de 1 hr) como disminuciones de eficacia de hibridación rápidamente si permiten a las diapositivas para secar para más que aquel tiempo.

30 Hibridación:

35 5. 2X buffer de hibridación: El 50 % formamide, 10X SSC y el 0.2 % SDS. Incube la solución hasta que esto alcance 48°C; 6. Las mezclas etiquetadas son suspendidas de nuevo en 9 µl el agua de l, y calentadas a 95°C durante 3 minutos para denaturarlas, y son centrifugadas a la velocidad máxima angular para 1 minuto; 7. Lo siguiente es añadido a cada tubo para bloquear la hibridación no específica. Haga una mezcla principal con los ingredientes siguientes para cada tubo:

40 ·Becerro Thymus ADN (1 µg / µL) 8 µl

· de correo (A) - ADN (10mg/mL) 2 µl

· levadura tRNA (4mg/mL) 2 µl

45 8. Entonces, aproximadamente 21 µl la l 2X el buffer de hibridación que ha sido precalentado a 48°C es añadido a la mezcla meta, bien mezclados, y centrifugados. Las muestras son mantenidas a 48°C hasta no está colocado sobre la diapositiva;

50 9. El objetivo etiquetado es aplicado a una diapositiva de microserie pre-híbrida y es cubierto con un cubierto de vidrio de 22 x de 60 mm; 10. La diapositiva es colocada en una cámara de hibridación sellada (Corning. Acton, MA), y 12 µl el agua de l es añadida a los pequeños depósitos a cada final de la cámara; 11. La cámara sellada es colocada a 48°C a baño maría e incubada para 40-60hr (2).

55 Los baños de posthibridación:

60 12. La serie es quitada de la cámara de hibridación con el cuidado para no molestar el cubierto; 13. La diapositiva es colocada en un estante en un plato que se mancha y que contiene 1X SSC, el 0.1 % SDS, y 0.1 mM DTT a aproximadamente 48°C; 14. El cubierto es quitado con cuidado mientras la diapositiva está en la solución e inquieta para 15 minuto; 15. Las diapositivas son transferidas a un plato que se mancha y contiene 0.1X SSC, el 0.1 % SDS, y 0.1 mM DTT a aproximadamente 48°C y agitadas para 5 minuto; 16. Repita el paso 15 otras dos veces; 17. Las diapositivas son transferidas a un plato que se mancha y contiene 0.1X SSC y 0.1 mM DTT a la temperatura ambiente y agitadas durante

5 minutos; 18. Repita el paso 17 por un tiempo adicional; 19. Hacen girar las diapositivas secadas. Las condiciones ejemplificadas encima son un protocolo estándar con el cual la persona experta será capaz de aplicar todas las modificaciones convenientes para realizar el método de la invención sin el empleo de habilidad inventiva.

- 5 El etiquetaje conveniente para los ejemplos encima, y para todos los ejemplos siguientes donde la fluorescencia es usada para la detección, puede ser realizado, p.ej. con Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Fluorescein, 6-Fam, Hex, Tet, Tamra, Joe, Rox, IRDyeTM700, IRDyeTM800, Dyomics Dyes, Atto Dyes o cualquier otro tinte conveniente comercial después de las instrucciones del fabricante
- 10 Otra técnica posible para realizar el método de la invención es utilizando el método de la extensión de base sola (SBE, single base extension en inglés). Según esta técnica la región meta es amplificada por PCR seguida de una reacción de sequencing con base sola usando una cartilla que temple una base dentro de la región polimorfa. Varios métodos de detección han sido descritos. Uno puede etiquetar la cartilla y aplicar los productos de extensión a la electroforesis de gel.
- 15 O el producto de extensión a base sola puede ser roto en más pequeños pedazos y medido por la Espectrometría de Masas. El método de detección más popular implica la fluorescencia etiquetada, dideoxynucleotide los terminadores que paran la extensión de cadena.
- 20 Como sabido por la persona experta, la extensión de cartilla es un mecanismo de discriminación allelic muy robusto. Es sumamente flexible y requiere el número más pequeño de cartillas/sondas. El diseño de sonda y la optimización del análisis son por lo general muy directos. Como para el método descrito encima, la persona experta, que comienza de la secuencia y el SNPS aquí revelado prontamente y fácilmente puede diseñar sondas convenientes simplemente que usan el software comúnmente disponible para el diseño de sonda.
- 25 Considerando la brevedad de la SEC ID el No. 5 y 1 y un o máximo dos SNPS para ser identificados, el diseño de las sondas convenientes no serán en particular difíciles o laboriosos y no requerirán el empleo de una habilidad inventiva, es suficiente el mero uso de procedimientos estándar o servicios aún disponibles en el comercio para el diseño de sonda. Hay numerosas variaciones en el acercamiento de extensión de cartilla que están basadas en la capacidad de polimerasis de ADN de incorporarse específico desoxirribonucleico complementario a la secuencia del ADN de plantilla. Sin embargo, ellos pueden ser agrupados en dos categorías: el primero es un sequencing (incorporación específica del nucleótido allele) el acercamiento donde es determinada la identidad de la base polimorfa en el ADN meta; el segundo es un acercamiento del PCR del allele-específico donde la polimerasis del ADN es usada para amplificar el ADN meta sólo si las cartillas PCR son absolutamente complementarias a la secuencia de ADN meta.
- 30
- 35 En el acercamiento del sequencing, uno puede o determinar la secuencia de ADN meta amplificado directamente por la espectrometría de masas o realizar reacciones de extensión de cartilla con el ADN meta amplificado como una plantilla y analizando los productos para determinar la identidad de la base(s) incorporada en el sitio polimorfo (incorporación del nucleótido específica del allele). Varios caminos han sido inventados en el arte para el análisis de producto de extensión de cartilla en análisis homogéneos.
- 40 En el acercamiento del PCR del allele-específico, uno confía en la polimerasis del ADN para ampliar una cartilla sólo cuando su final 3' es absolutamente complementario a la plantilla.
- 45 Cuando esta condición es encontrada, un producto PCR es producido. Determinando si un producto PCR es producido o no, uno puede deducir el allele encontrado sobre el ADN meta. Varios accesos han sido utilizados para descubrir la formación de productos específicos de PCR en análisis homogéneos, p.ej. basados en el análisis de la curva que se derrite, o basado en la hibridación de sondas meta específicas. Una variación de este acercamiento es la extensión de cartilla allele-específica. Aquí, el producto PCR que contiene el sitio polimorfo sirve como la plantilla, y el final 3' de la sonda de extensión de cartilla consiste en la base de allele.
- 50 La cartilla es ampliada sólo si la base 3' complementa al allele presente en el ADN meta. La supervisión del acontecimiento de extensión de cartilla, por lo tanto, permite deducir el allele(s) encontrado en la muestra de ADN.
- 55 SBE también fácilmente puede ser realizado sobre microseries que usan la técnica de SBE-ETIQUETA conocida. Los protocolos convenientes para realizar esta encarnación de la invención son descritos en manuales como, por vía del ejemplo, en " microseries de ADN: un manual de reproducción molecular " por David Bowtell, Joseph Sambrook, Protocolo 6, paginas 403-420, aquí incorporado por la referencia. En el protocolo 6 del manual antedicho son descritas detalladamente todas las enseñanzas que son necesarias a la persona experta para el diseño de esta encarnación de la invención, de la selección de cartilla y del diseño de buffers.
- 60

- 5 La persona experta de ahí fácilmente puede realizar esta encarnación de SBE-tag de la invención que comienza de las enseñanzas de la presente descripción sin el empleo sobre la habilidad inventiva y sin preparativos incómodos. Otro protocolo conveniente para una identificación SBE DEL SNP de interés sobre microseries es la serie de etiqueta Affymetrix, el protocolo que ser(es) también disponible sobre manuales como el manual mencionado aquí encima por Bowtell y Sambrook, descrito detalladamente en el Protocolo 7, paginas 421-428 aquí incorporado por la referencia.
- 10 Una remota técnica conveniente para la identificación del SNP(s) de interés es la técnica de la ligadura. En la Ligadura del Oligonucleotide Allele Específico, diseñando oligonucleotides complementarios a la secuencia meta, con la base allele-específica a su finales 3' o 5', uno puede determinar el genotipo del PCR la secuencia meta amplificada por determinando si un oligonucleotide complementario al ADN sequencing lindando con el sitio polimorfo es tras ligado al oligonucleotide del allele-específico o no. Este análisis confía en el hecho que el ADN ligase es una enzima que es sumamente específica en el reparar mellas en la molécula de ADN.
- 15 Cuando dos oligonucleotides adyacentes son templados a una plantilla de ADN, ellos están ligados juntos sólo si el oligonucleotides empareja perfectamente la plantilla en la unión.
- 20 Oligonucleotides de Allele-específico, por lo tanto, puede interrogar la naturaleza de la base en el sitio polimorfo. Uno puede deducir el allele (s) presente en el ADN meta por determinando si ligadura ha ocurrido. La ligadura tiene el nivel más alto de especificidad y es lo más fácil optimizar entre todos los mecanismos de discriminación del allelic, pero esto es la reacción más lenta y requiere el número más grande de sondas modificadas. Sin embargo, la ligadura como un mecanismo tiene el potencial de genotipo sin la amplificación previa por el PCR.
- 25 Esto puede ser logrado por la reacción en cadena de ligadura (LCR) o por el empleo de la ligadura (el candado) las sondas que son primer circularizadas por el ADN seguidas por la amplificación del señal de círculo.
- 30 También la técnica de la ligadura es aplicable sobre microseries, en este caso, llaman la técnica más expresamente Ligadura de Reacción de Detección - la Serie Universal (LDR-UA) y permite a la detección de los Polimorfismos de Nucleótidos Solos (SNPs) sobre moléculas de ADN. La técnica LDR-UA aprovecha dos sondas diferentes, la Sonda llamada Común (CP) y Distinguiendo la Sonda (DP), que es diseñada para templar yuxtapuesto sobre el ADN de un solo hilo meta. DP templa sobre el ADN en el final 5' de CP. Las dos sondas pueden ser ligadas con thermo-estable como el Pfu Ligase.
- 35 Si la complementariedad entre el final 3' del DP y el ADN meta no es perfecta, la reacción de ligadura es comprometida. Por esta razón también llaman la última base en el final 3' del DP distinguiendo la base.
- 40 El sistema requiere que las sondas lleven las siguientes modificaciones:
- Cada DP debe ser etiquetado por fluóforo distinto en su final 5'.
 - El CP debe ser fosforilado en su final 5' y debe ser ampliado en su final 3' con un código " Zip Code " la secuencia, que es complementaria e inversa de la secuencia del " Zip Code " descubierta sobre la Serie Universal. Cada CP corresponde a un " Zip Code" diferente.
- 45 El producto de ligadura es hibridado al UA. Cada punto de UA es compuesto de las secuencias de ADN " Zip Code" diferentes que capturan la correspondencia " Zip Code" secuencias en el CP del final 3'. El CP-DP ligadura el acontecimiento coloca el fluóforo en el final 5' del DP sobre la correspondencia UA el punto que es visualizado por la subsecuente exploración del UA. La señal de un punto por lo tanto indica el partido perfecto entre el DP y el ADN meta.
- 50 Otra vez, para las técnicas de la ligadura, el diseño de las sondas que comienzan de la SEC ID el No. 5 o 1 y sabiendo que el SNPS de interés está en la posición 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 o 1 da la selección de las cartillas simples para la persona experta.
- 55 Los CP y DP (el término se extendió también a la técnica de la ligadura cuando no es realizado sobre apoyos sólidos) pueden pedir a los servicios disponibles en el comercio especializados para el diseño y la construcción de esta clase de sondas. Para los objetivos del método aquí descrito, aún no será necesario diseñar un DP para cada forma de allele del SNPS, como el objetivo exclusivo es la identificación de C (o G en el caso del hilo complementario) en la posición 108 dela SEC ID el No. 5 y/o de G (o C en el caso del hilo complementario) en la posición 171 de la SEC ID el No. 5.
- 60 La sonda(s) DP específica para T (en caso del hilo complementario) allele en la posición 108 de la SEC ID el No. 5 y/o para El un (la T en caso del hilo complementario) allele en la posición 171 de la SEC ID el No. 5 puede ser etiquetada por un color diferente por la entereza del método.

En una encarnación aún remota, la identificación del SNP (s) en posición 108 y/o 171 de la SEC ID el No. 5 o 1 puede ser realizado por la técnica de la hendidura invasiva como descrito, p.ej. por Wilkins Stevens P. et 2001.

5 Como indicado encima, también esta técnica es conocida por la persona experta como un acercamiento conveniente para la identificación de SNPS.

El análisis de hendidura invasivo es un ciclismo de sonda, la reacción de amplificación de la señal usada para la detección de polimorfismos de nucleótido solos (SNPs).

10 La reacción requiere dos oligonucleotidos sintéticos, llamados el 'oligonucleotide ascendente' y 'sonda', que temple a la secuencia meta con una superposición de 1 nt.

15 Esto crea un complejo de superposición bifurcado que se parece a una estructura generada durante la síntesis del ADN de desplazamiento del hilo. 5' nucleasas específicas de estructura, cuya función de célula primaria, como se cree, es de procesar los fragmentos de Okazaki, hender el sustrato bifurcado en el sitio de la superposición, y liberaR el 5' y una base del nucleótido apareado de la sonda. El hendido 5' sirve como una señal que indica la presencia del objetivo en una muestra analizada.

20 Realizando la reacción invasiva en la sonda que derrite la temperatura (la Tm), pueden ser alcanzados múltiples acontecimientos de hendidura para cada objetivo. Típicamente una reacción de amplificación de señal invasiva genera 30-50 sondas hendidas/objetivo/minuto, causando 103-104-fold amplificación de señal en una reacción de 1-3 h. La capacidad única de 5'-nucleasas para expresamente hender el sustrato que se superpone puede ser utilizada para la detección de mutaciones de una sola base. Descubrir un nucleótido particular en la secuencia meta, el oligonucleotide ascendente y la sonda son diseñados para crear la superposición en este nucleótido, asegurando la hendidura eficiente de la sonda. Una sustitución a esta posición del nucleótido elimina la superposición y reduce radicalmente la tarifa de hendidura, causando la discriminación de mutación de al menos 300:1.

Tal poder discriminatorio hace el análisis de hendidura invasivo un instrumento excelente para la identificación de SNPS.

30 La detección de señal puede ser realizada por la electroforesis, la microplaca (el microtítulo), el análisis inmunosorbente del enzima ligado (ELISA, en inglés enzyme-linked immunosorbent assay), el láser matrix-assisted tiempo-de-vuelo desorción/ionización (MALDI-TOF, en inglés matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight), los métodos de espectrometría de masas, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (el FRET), y la metodología.

35 El análisis de hendidura invasivo, como otras técnicas mencionadas anteriormente, es adaptable a un formato de fase sólido que presenta la posibilidad de analizar SNPS múltiples o muestras múltiples para un solo SNP en paralelo. La detección de SNP que usa la reacción de hendidura invasiva puede ser realizada en 96 microplacas con las cantidades de nanogramo de ADN por SNP.

40 Además, el SNP puede ser identificado por el método de SniPer que permite a la discriminación de alleles examinando la presencia o la ausencia de amplificación por RCA (rodando la amplificación de círculo). Brevemente, el ADN para ser usado como una plantilla es linealizado. Entonces, una sonda es hidridada a este ADN linealizado. Cuando la secuencia de sonda y la secuencia del ADN linealizado como una plantilla son complementarias el uno al otro y forman un hilo complementario, el ADN genómico puede ser convertido en un ADN circular por la reacción de ligadura. Por consiguiente, RCA de los beneficios del ADN circular, pero el ADN no es ligado para ser circular cuando los finales de la sonda no coincide con el ADN genómico.

45 Así, la reacción RCA no continúa. Por lo tanto, en el método Sniper es diseñada una sonda sola bloqueada que temple con el ADN genómico, y es circularizable. Es llamada sonda de candado esta sonda sola-bloqueada. Las secuencias de los dos finales de esta sonda de candado son diseñadas de modo que correspondan al SNP para ser descubierto. Entonces, esta sonda de candado y el ADN genómico son mezclados con la ligadura. Si los dos finales de la sonda de candado y el sitio de SNP del ADN genómico son complementarios el uno al otro, los dos finales de la sonda de candado son unidos por ligadura, cediendo una sonda circular. Si los dos finales de la sonda de candado y el sitio de SNP del ADN genómico no son complementarios el uno al otro, la sonda no se hace circular.

50 Por lo tanto, sólo aquellas sondas de candado que son complementarias al SNP para ser descubierto se hacen circulares y son amplificadas por la polimerasis de ADN. Descubriendo la presencia o la ausencia de esta amplificación, el SNP puede ser descubierto. Para la detección, son usados los oligonucleotidos sintéticos que tienen un tinte fluorescente y un quencher a sus respectivos finales y también tienen una estructura de horquilla.

60

Finalmente, aquí es revelada una remota técnica aplicable al método diagnóstico, que es la amplificación de un fragmento que comprende un o ambos de los nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 o 1 y sequencing del mismo con la identificación directa de un o ambos de nucleótidos 108 y 171 (y/o de sus nucleótidos complementarios).

5 El sequencing prontamente y fácilmente puede ser realizado con secuenciadores automatizados.

10 Cuando se realiza una secuencia del fragmento, las cartillas de amplificación de la SEC ID el No. 2 y 4 son convenientes también para esta técnica. Es evidente que cualquier par de cartilla conveniente para la amplificación específica de todo o la parte de la SEC ID el No. 5 o 1 proveyó esto un o ambos de los nucleótidos 108 y 171 es comprendido en el amplicon obtenido (y/o un o ambos de los nucleótidos correspondientes en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5 o 1), o cualquier sonda que se superpone con un o ambos de nucleótidos 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 o 1 (y/o un o ambos de los nucleótidos correspondientes en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5 o 1) puede ser usado para realizar el método de la invención, y que la invención no es limitada con las cartillas de la SEC ID el No. 2-4.

15 En todas las encarnaciones descritas encima, donde las técnicas usadas permiten la distinción dentro de dos alleles diferentes del SNP(s) de interés, un control podría ser realizado descubriendo también el allele que lleva T (un en caso del hilo complementario) en posición 108 de la SEC ID el No. 5 y/o de una A (T en caso del hilo complementario) que es específico para el fitoplasmas del mismo grupo taxonómico y los subgrupos que no son asociados (pero confusable en términos de síntomas de la planta hasta un cierto punto) a FD (p.ej. fitoplasma asociado con EY, ALY Y ULW). Es evidente que en un kit para realizar el método diagnóstico aquí describió sondas convenientes puede proporcionar también para la detección del allele específico para el fitoplasma asociado con EY, ALY Y ULW.

20 Como declarado encima, el método diagnóstico aquí revelado, puede ser realizado sobre apoyos sólidos. Apoyos sólidos convenientes pueden estar una cuenta de látex, una diapositiva de vidrio, un chip de silicio, o las paredes de un microtítulo. En algunos casos, específicos oligonucleotides marcadores están colocados sobre el apoyo sólido, y la reacción de discriminación allelica es hecha sobre el apoyo mientras que en otros casos, oligonucleotides genéricos están colocados sobre el apoyo sólido, y ellos son usados para capturar etiquetas de secuencia complementarias conjugadas a las sondas marcadoras específicas.

25 Cuando oligonucleotides marcadores específicos están colocados sobre el apoyo sólido, el acto de series de oligonucleotide como una colección de reactores donde las moléculas de ADN objetivo encuentran a sus colegas, y el paso de discriminación allelica para numerosos beneficios de marcadores en paralelo. Cuando oligonucleotides genéricos son colocados sobre el apoyo sólido, se usan oligonucleotides puestos en orden para clasificar los productos de las reacciones de discriminación allelica (también hecho en la paralela) realizados en la solución homogénea. En ambos los casos, conocen la identidad de un oligonucleotide sobre una cuenta de látex o en una posición particular sobre la microserie (sobre una diapositiva de vidrio o un chip de silicio), y el genotipo es deducido determinando que lo que inmovilizó el oligonucleotide es asociado con una señal positiva.

30 La ventaja clara de realizar reacciones de genotipo sobre apoyos sólidos consiste en que muchos marcadores o, en este caso muchas muestras, pueden ser interrogadas al mismo tiempo. Además del ahorro de tiempo y reactivo, realizando numerosas reacciones en la paralela también se disminuye la probabilidad de la mezcla de prueba/resultados.

35 Como antes mencionado, la detección del producto obtenido por el primer paso del paso de identificación a), p.ej. el producto obtenido por las técnicas ya mencionadas, puede ser realizado supervisando la emisión ligera de luz, midiendo la masa, supervisando la radiactividad o con el sequencing de dicho producto.

40 Según la presente descripción, dijo que la supervisión de la emisión ligera de luz puede ser realizada supervisando la fluorescencia, la luminescencia, el tiempo la fluorescencia resuelta, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, o la polarización de fluorescencia, midiendo la masa puede ser realizado por la espectrometría de masas y supervisando la radiactividad puede ser realizado con instrumentos sensibles a la radiactividad.

45 La supervisión de la emisión ligera de luz es la modalidad de detección el más extensamente usada en genotipo, esto puede ser hecho por midiendo o descubriendo la luminescencia, la fluorescencia, el tiempo la fluorescencia resuelta, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (el FRET), y la polarización de fluorescencia (FP).

50 La luminescencia es emitida en una reacción ATP-DEPENDIENTE de luciferase. Cuando la producción ATP es acoplada con una reacción de extensión de cartilla, la luminescencia es observada siempre un desoxirribonucleico es añadido a la reacción de extensión de cartilla. La luminescencia puede ser medida con analizadores comerciales convenientes después de las instrucciones del fabricante (1700 p.ej. Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer).

55

- 5 La fluorescencia puede ser medida usando la fluorescencia disponible en el comercio dispositivos de imagen sensible o aparatos de medir conocidos en el arte y sondas etiquetadas o productos amplificados según la tecnología seleccionada para realizar el método aquí descrito. Fluoróforos convenientes para etiquetar los ácidos nucleicos de interés pueden ser seleccionados del grupo que consiste en Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Fluorescein, 6-Fam, Hex, Tet, Tamra, Joe, Rox, IRDyeTM700, IRDyeTM800, Dymomics Dyes, Atto Dyes.
- 10 La detección puede ser realizada después de las instrucciones de fabricación. La persona experta está bien consciente que todas las técnicas indicadas encima pueden ser realizadas todas con fluoróforos después de protocolos convencionales.
- 15 La detección por la fluorescencia resuelta por tiempo puede ser hecha con tintes que tienen una vida de mitad larga (como Lanthanides), la lectura de la fluorescencia es suficientemente hecha mucho después de la excitación, tal que no es observada la autofluorescencia (que tiene una media vida muy corta). Como los lantánidos son los compuestos inorgánicos que no pueden ser usados para etiquetar ácidos nucleicos directamente chelator orgánico conjugado a la sonda debe ser usado para atar los lantánidos en la reacción. Los protocolos están disponibles para esta clase de detección.
- 20 También para esta clase de protocolos estándar de detección y protocolos de fabricantes están disponibles a la persona experta.
- 25 La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (el FRET) ocurre cuando dos condiciones son encontradas. Primero, el espectro de emisión del tinte de donante fluorescente debe superponerse con la longitud de la onda de excitación del tinte de aceptador. Segundo, los dos tintes deben estar en la proximidad cercana el uno al otro porque la transferencia de energía se baja rápidamente con la distancia. El requisito de proximidad es lo que hace el FRET un método de detección bueno para un número de mecanismos de discriminación allelica. Básicamente, cualquier reacción que junta o separa dos tintes puede usar el FRET como su método de detección.
- 30 La detección de FRET, por lo tanto, ha sido usada en la extensión de cartilla y reacciones de ligadura donde las dos etiquetas son traídas en la proximidad cercana el una al otra. Esto también ha sido usado en la 50 reacción nucleasa, la reacción de faro molecular, y las reacciones de hendidura invasivas donde el par de donante/aceptador vecino es separado por la hendidura o la interrupción de la estructura de lazo de tallo que los sostiene juntos. El par de tintes conveniente para la detección de FRET son conocidos en el arte.
- 35 FP puede ser usado en varias técnicas de detección SNPS, a la persona experta están disponibles sistemas comerciales como Perkin Elmer AcycloPrime™-FP Sistema de Detección SNP.
- 40 Según la presente descripción también los sistemas que hacen inútil de tintes fluorescentes pueden ser usados para la detección del SNPS, un sistema comúnmente usado es la espectrometría de masas (MS.) donde el peso molecular de los productos formados es medido. En la detección de MS. No es necesaria ninguna etiqueta. La alta resolución que MS. fácilmente puede distinguir entre las moléculas de ADN que se diferencian por sólo una base en las veces de milisegundos para analizar cada muestra. MS. puede ser medida con espectrómetros disponibles en el comercio de masas después de protocolos estándar.
- 45 Un remoto método requiere que el empleo de radiolabels en vez de etiquetas fluorescentes y en esta radiactividad de caso de la muestra sea medido de modos estándar conocidos en el arte.
- 50 Otra encarnación de la presente invención es un kit diagnóstico para el diagnóstico de la enfermedad de vid Flavescence dorée comprendiendo el reactivo para la identificación de un o ambos de los nucleótidos en posición 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 y/o de uno o varios de sus nucleótidos complementarios en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 5 en un líber de la planta.
- 55 El kit de la presente invención comprende algunos o todos los enzimas de los componentes necesarios (convenientemente para un análisis intencionado. Los ejemplos de tales componentes incluyen, pero no son limitados, oligonucleótidos etiquetados y/o no etiquetados, polimerasas (p.ej. polimerasas Taq), buffers (p.ej. buffer Tris), dNTPs etiquetado o no etiquetado, control reactivos (p.ej. muestras de tejido, oligonucleótidos meta para mandos positivos y negativos, etc.), etiquetando y/o reactivos de detección (tintes fluorescentes como VIC, FAM), apoyos sólidos, manual, diagramas ilustrativos y/o información de producto, inhibidores, y agentes que ajustan el embalaje ambiental a (p.ej. hielo, desecando a agentes).
- 60 El kit de la presente invención puede ser un kit parcial que comprende sólo una parte de los componentes necesarios. En este caso, usuarios pueden proporcionar los componentes restantes. El kit de la presente invención puede

comprender dos o más contenedores separados, cada uno para contener una parte de los componentes que se quieren utilizar. Por ejemplo, el kit puede comprender un primer contenedor que contiene una enzima y un segundo contenedor que contiene un oligonucleotide.

- 5 Los ejemplos específicos de la enzima incluyen también una enzima de hendimiento específica de estructura, ligases u otras enzimas para el empleo en las técnicas para la identificación y la detección descrita encima contenida en un buffer de almacenaje apropiado o un contenedor. Los ejemplos específicos del oligonucleotide incluyen nucleótidos para el RT-PCR, nucleótidos para la técnica de extensión descrita encima, nucleótidos para la técnica ligadura descrita encima, oligonucleotides para la técnica LDR-UA descrita encima, oligonucleotides para la técnica de invasor descrita encima, oligonucleotides de sondas para la técnica de hibridación descrita encima, oligonucleotides meta para el empleo como el control, y otros por el estilo.

El oligonucleotides puede ser etiquetado según la técnica seleccionada.

- 15 O bien, pueden proporcionar la mena o más componentes de reacción en tal manera que ellos son predivididos en las partes de una cantidad específica. Los componentes de reacción seleccionados también pueden ser mezclados y divididos en las partes de una cantidad específica. Es preferido que los componentes de reacción debieran ser predivididos en partes y contenidos en un reactor. Los ejemplos específicos del reactor incluyen, pero no son limitados, tubos de reacción o pozos, o placas de microtítulo. Es preferible sobre todo que el componente de reacción predividido debiera ser mantenido seco en un reactor mediante, por ejemplo, la deshidratación o la sequedad de helada.

El kit de la invención más lejos puede comprender apoyos sólidos en el que oligonucleotides para la identificación de un o ambos de los nucleótidos en la posición 108 y 171 de la SEC ID No. 5 es anclado en posiciones conocidas sobre el dicho apoyo en una o en varia copia por posición.

- 25 El anclaje del oligonucleotides/sondas como descrito encima en la sección relacionada con las técnicas convenientes para realizar el método será anclado al apoyo sólido por técnicas estándar seleccionadas según el apoyo escogido.

El kit de la invención puede comprender la correspondencia de sondas etiquetadas y/o complementarias a una región de la SEC ID el No. 5 corriente arriba y/o río abajo de un o ambos de los nucleótidos en la posición 108 y 171 de la SEC ID el No. 5 y/o la superposición una región que comprende un o ambos de los nucleótidos en la posición 108 y 171 de la SEC ID el No. 1.

- 35 Los oligonucleotides ascendentes y descendentes pueden ser directamente adyacentes a uno de los nucleótidos 108 o 171 de la SEC ID el No. 1 o a su nucleótido complementario en la secuencia complementaria a la SEC ID el No. 1 p.ej. en caso de kit para la identificación por ligadura o por otras técnicas como ejemplificado encima del requerir sondas directamente adyacentes al SNP; o puede ser no directamente adyacente al nucleótido SNP cuando los kit están para la identificación con técnicas como ejemplificado encima que no requieren sondas directamente adyacentes al SNP.

40 Todas las sondas y los oligonucleotides de la invención (p.ej. sondas descritas para el método y para el kit) la caída dentro de la definición de los fragmentos de la SEC ID el No. 1 o de su secuencia complementaria y serán de una dimensión comprendida entre aproximadamente 8 a aproximadamente 100 nucleótidos, normalmente de una dimensión comprendida entre aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos. Cuando los fragmentos y sondas no comprenden un o ambos el SNPS de interés ellos también se caen dentro de la definición de los fragmentos de la SEC ID el No. 5 o de su secuencia complementaria y serán de una dimensión comprendida entre aproximadamente 8 a aproximadamente 100 nucleótidos, normalmente de una dimensión comprendida entre aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos.

50 Los fragmentos, por otra parte, incluyen también los fragmentos que son más grandes que el oligonucleotides y las sondas, podrían ser representados p.ej. por amplicons y pueden atravesar de las dimensiones del oligonucleotides y sondas indicadas encima, a una longitud igual a la longitud de la SEC ID el No. 1 menos 1 nucleótido.

Según una encarnación de la invención antes ejemplificada, las sondas y los oligonucleotides del kit pueden ser etiquetados por un fluoróforo, p.ej. por un fluoróforo seleccionado del grupo que consiste en Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Fluorescein, 6-Fam, Hex, Tet, Tamra, Joe, Rox, IRDyeTM700, IRDyeTM800, Dyomics Dyes, Atto Dyes.

La persona experta entenderá que la selección de las tintas para etiquetar las sondas y oligonucleotides toma parte de las normales habilidades de un técnico experto de genética molecular.

60 El kit también puede comprender el vector descrito en la encarnación de control positiva o negativa como descrito encima, o puede comprender tanto un positivo como un control negativo p. ej. el control positivo comprenderá FD SNP

específico del fitoplasma asociado y/o SNPS revelado en la presente descripción (p. ej. de la SEC ID el No. 1) y el control negativo comprenderán en SNP revelado o el sitio/s SNPS una secuencia de la SEC ID el No. 5 cuando la SEC ID el No. 5 no es la SEC ID el No. 1.

- 5 Estos controles permitirán la verificación del correcto funcionamiento del kit o del método aquí descrito sin la necesidad de los ácidos nucleicos del fitoplasma como controles.

10 Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen expresamente la SEC ID el No. 7, pueden ser preparados según las técnicas estándar y aún comprados por empresas especializadas en la preparación de anticuerpos de la SEC ID el No. 7. El anticuerpo puede ser producido según cualquier técnica estándar conocida, como descrito también en los capítulos relacionados con la producción monoclonal y policlonal en el manual " Métodos Básicos en la Producción de Anticuerpo y la Caracterización " corregido por G.C. Howard y D.R. Bethell, el editor, CRC la Prensa, 2001.

15 En otro manual comúnmente usado en laboratorio para la identificación del fitoplasma asociado con la FD puede ser realizado por análisis inmunológicos sobre muestras de líber de vid donde la célula lysis ha sido realizada para exponer la proteína ribosomal L14 de la SEC ID el No. 7 expresada dentro de la célula infectada.

20 Por lo tanto, por vía del ejemplo, el método para la detección del fitoplasma asociado a la FD en una muestra de vid podría ser realizado, en el que un anticuerpo primario expresamente que reconoce la SEC ID el No. 7 y un anticuerpo etiquetado secundario expresamente que reconoce el anticuerpo primario es usado en un análisis inmunodetección sobre una muestra de líber de vid en el que ha sido realizada la célula lisis.

25 EJEMPLOS

aislamiento rpl14

5 tensiones de fitoplasma (EY1, ULW, ALY, FD92 y FD-C) perteneciendo al grupo 16SrV fueron usados en este trabajo.

30 FD92 y FD-C representó dos tensiones de Flavescence dorée, mientras que EY1 Y ALY son dos tensiones no asociadas con la FD, pero esporádicamente presentes en la vid.

35 Extracción de ADN: los ácidos nucleicos totales (TNA) fueron extraídos como antes descrito (Angelini et al., 2001). 1g de hoja fresca de vincapervinca y venas de vid fueron homogeneizados en CTAB protegen el 3 % (el 3 % CTAB, 100mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA, 1.4 M NaCl, el 0,1 % 2-mercaptoethanol). 1ml de solución fue transferida a un 1,5ml el tubo y fue incubada durante 20 minutos a 65 °C. Entonces, fue añadido un volumen igual de cloroformo y, después de que la centrifugación, la fase superior que contiene el ADN fue precipitada con un volumen igual de isopropanol y recogido por centrifugación. La bola de ADN fue lavada con el etanol del 70 %, secada y disuelta en 100ul de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, el pH 7.6).

40 Para obtener la secuencia parcial de S10-spc operon, el ADN extraído no diluido fue amplificado usando la cartilla avanzada rpF1 (V), fue colocado en el final 3' del gene rps19 (el Lee et al., 1998) y la cartilla inversa FD9r, colocado en el final 3' del gene secY (Martini et al., 2002). El rpF1 (V)/fd9r amplicons tenía un tamaño esperado de 9Kbp, aproximadamente. Productos PCR directos fueron diluidos 1:50 en el agua estéril y usados en el análisis anidados PCR realizados mediante la cartilla avanzada rp (V) F1A (el Lee et al., 2004) y la cartilla inversa FD9r2 (Martini et al., 2002), que amplificó un producto de un tamaño esperado de 8Kbp, aproximadamente, comprendido entre el gene rpl22 y secY sobre S10-spc operon.

45 PCR's fueron realizados empleando el ADN Taq de Platino® la Polimerasis de Alta Fidelidad (Invitrogen, Alemania). La mezcla PCR (el volumen total 25 µ l) la plantilla de ADN contenida (1 µ la l de ADN no diluido extraído para dPCR, y 2 µ la l de 1:50 diluyó productos dPCR para nPCR), 0.25mM cada dNTP, 0.4 µ M cada cartilla, 1.5U de Platino® de Alta Fidelidad. Para la amplificación PCR, 36 ciclos fueron conducidos en T3000 automatizado Thermocycler (Biometra GmbH, Goettingen, Alemania), en las siguientes condiciones: 45sec en 94°C (denaturación), 30sec en 56°C (templadura), 9min (dPCR) o 8min (nPCR) en 68°C (extensión), y 10min en 72°C (extensión de ciclo final). El ADN extraído de plantas de vincapervinca sanas y la mezcla de reacción PCR desprovista de ADN fue usado como mandos negativos. PCR productos (5 µ l) fueron analizados por la electrofóresis en el 1 % agarose el gel , manchado con bromuro ethidium, y visualizado con un UV transilluminator.

50 El producto PCR rpF1A/FD9r2 cubriendo la región del S10-spc operon entre los genes rpl22 y secY, era ordenado. Una estrategia que anda secuencia fue realizada mediante 30 cartillas intermedias diseñadas sobre el en curso la secuencia.

La reconstrucción del 6,3Kb amplicon la secuencia fue obtenida por usando el Programa de Montaje Contig (CAP) del software Bioedit versión 7.0.0 ([http:// www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)).

5 Para buscar los Marcos de Lectura Abiertos (ORFs Open Reading Frames) y deducir las secuencias de las proteínas codificadas, nuestra secuencia entera fue analizada usando el ExPasy Proteomics el Servidor ([http:// us.expasy.org/tools/dna.html](http://us.expasy.org/tools/dna.html)) (Gasteiger et al., 2003).

Diseño de análisis diagnóstico

10 Los amplicons ordenados entonces fueron comparados el uno con el otro para identificar la variación de secuencia que permitiría a la identificación de regiones convenientes para el diseño de análisis diagnósticos.

15 La alineación de secuencia fue realizada con el software ClustalW, y fue observada la alta homología de secuencia entre diferentes aislados examinados. En particular, hemos identificado los nucleótidos comunes tanto a la FD (FD92 como a FD-C) que los diferencia de otro aísla la pertinencia al grupo 16SrV (Fig1). Este nucleótido fue localizado en el gene rpl14 (381bp).

20 Una parte de este gene fue sometida en el software Primer Express, para diseñar un análisis específico para la FD sobre la base de este SNP identificado.

Hemos identificado un fragmento de nucleótido de 100bp que incluye dos cartillas y una sonda conveniente para descubrir el fitoplasma de la FD.

Optimización de análisis de Especificidad y Sensibilidad

25 Para obtener la especificidad a la FD con las cartillas de la SEC ID 2-4 hemos modificado el perfil convencional termal de PCR. Por lo general, templando y la extensión es realizado a 60 °C, sin embargo si la reacción fuera conducida en esta T °, no fue observada ninguna especificidad a la FD. Por lo tanto, levantamos T ° a 61,5 °C para alcanzar más especificidad. De hecho, cuando no trabajamos en esta condición de reacción PCR ninguno que la amplificación en el control negativo (EY1 - ALY) fue observada. (Tabla. 1).

35 En la tabla 1 se muestran las diferencias entre el mismo análisis conducido a 61,5 °C (A) y 60 °C (B). Es importante subrayar dos diferencias principales: i) a 61,5 °C ningún control negativo mostró la señal fluorescente, esto confirmó la especificidad del análisis de la FD ii) sin embargo, a 60°C de los que hemos observado una sensibilidad aumentada del análisis para la muestra de vid infectada por la FD, como mostrado en la columna del valor ΔC_t (diferencia entre un análisis y B). En las muestras 7, el valor ΔC_t era más alto de 5 fold en un que B, sin embargo el control negativo EY y ALY mostró la señal de amplificación. En el higo 2 es descrito un ejemplo de argumento de amplificación. Los resultados son representados en la Tabla 1 debajo.

40 Tabla1. Comparación entre el análisis-conducido con la prueba (sonda) FD66 a 61,5 °C (A) y 60 °C (B)-, análisis PCR/RFLP y pruebas serológicas (E.L.I.S.A). sobre muestras de hoja infectadas y vides sanas.
Media Ct

Tipos de muestras	n.	Código de las muestras	A	B	Δ CT	PCR/RFLP	ELISA
Hojas de vid	1	136	31,17	30,07	1	+	-
	2	137	34,46	34,41	0	+	-
	3	143	32,36	27,25	5	+	-
	4	144	32,49	26,43	6	+	-
	5	145	32,2	29,62	3	+	-
	6	146	34,56	28,09	6	+	-
	7	147	32,2	28,36	4	+	-
	8	148	33,03	25,96	7	+	-
	9	150	34,17	29,84	4	+	-
	10	151	35,03	33,96	1	+	-
	11	152	32,96	26,88	6	+	-
	12	153	31,23	27,97	3	+	-
	13	154	32,04	29,62	2	+	-
	14	155	34,31	28,69	6	+	-
control positivo	FD		18	16	2	+	+(muy débil)
control negativo	EY		negativo	33	-	+	-
	ALY		negativo	33	-	+	-
	AY		negativo	negativo		negativo	nt
	STOL		negativo	negativo			negativo

Leyenda:

nt - no probado

- 5 La tabla 1 muestra las diferencias entre el mismo análisis conducido a 61,5 °C (A) y 60 °C (B) y con el kit comercial ELISA (SEDIAG®, Francia). 15 muestras fueron probadas para evaluar la sensibilidad y la especificidad del análisis FD66 RTPCR. En la condición A, el análisis fue conducido a 61,5 °C y podemos observar la alta especificidad para fitoplasma FD, pero menos sensibilidad. En la condición B, el análisis fue conducida a 60 °C, y hemos observado una sensibilidad aumentada del análisis para la muestra de vid infectada por la FD, pero una especificidad pobre para el fitoplasma de la FD. La diferencia en la sensibilidad de las dos condiciones fue calculada usando el valor Δ Ct. Ningún fitoplasma fue descubierto usando la prueba ELISA.

Preparación de la muestra para la prueba E.L.I.S.A.

- 15 Las muestras estuvieron preparadas siguiendo las instrucciones del fabricante, y la prueba E.L.I.S.A. fue realizada a la misma manera. Debido a los resultados negativos obtenidos, y a la mucha débil señal obtenida sólo para el control previsto en el kit, las hornadas diferentes del kit SEDIAG® 480 fueron probadas con los mismos resultados relatados en la Tabla 1.
- 20 La tabla muestra una comparación entre el método convencional actualmente usado (el PCR-PUNTO-FINAL) y la prueba diagnóstica aquí propuesta (basada PCR en tiempo real).

- 25 No comparamos el método propuesto con el preexistente (Bianco et al., 2004) porque: i) en estas hojas el objetivo era un producto PCR mientras en el presente análisis usamos el TNA e ii) el objetivo de secuencia en el papel antedicho era el gene 16Sr del ADN mientras en el presente método propuesto, el objetivo es un gene de una proteína ribosomal.

El protocolo relatado en la literatura está siempre basado en la presencia de un SNP. Esto puede distinguir FD DE EY, pero, como antes descrito, son necesarias dos reacciones de amplificación para expresamente descubrir el fitoplasma

asociado con la FD. Por lo tanto, el método propuesto en la presente invención representa una nueva tecnología comparada a las técnicas anteriores.

Hybridización sobre microserie

5

El ADN genómico amplificado es etiquetado por el kit "Sistema de Etiquetaje Total Genómico BioPrime®" (INVITROGEN - 18097-012) siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra etiquetada es precipitada por Spin – Vacuum Savant y es posteriormente re suspendida en la solución hibridada.

Microserie de hibridación:

Las pruebas (sondas) que comprenden un o ambas regiones SNPS de interés han sido bloqueadas sobre la diapositiva para la detección del fitoplasma SNP (s) asociado con la FD revelado en la presente descripción, en 16 copias por prueba (sonda). Antes de la reacción hibridada, la activación de la diapositiva será realizada (la química superficial de vidrio: EPOXY Surface Coating Slides; spotting buffer: Scott-Nexterion buffer para manchar; concentración de prueba (sonda): 30 μ M), por el empleo de una solución obstructora (10x Citrato de Salina de Sodio (SSC), Sodio del 0.1 % Dodecyl Sulfato (SDS), 0.066 Sodio Tetrahydridoborate (NaBH₄), H₂O hasta 50ml). La diapositiva es tratada con la solución obstructora durante 20 minutos a 42°C. Los lavados son realizados: dos veces (Citrato de Salina de Sodio 1x durante 5 minutos en temperatura ambiente), dos veces (Citrato de Salina de Sodio 0.1x durante 5 minutos en temperatura ambiente).

20

Prehibridación:

Una solución que consiste en: 5x el Citrato de Salina de Sodio (SSC), el Sodio del 0.1 % Dodecyl el Sulfato, 200 μ el ADN de Esperma de Salmón de g, 5x la Solución de Denhardt (5g Ficoll, 5g el Polivinilo pyrrolidone, 5g albumin de suero bovino, fracción la V, H₂O hasta 500ml), H₂O hasta 2ml está preparada. La solución debe ser filtrada por 0.2 μ filtros de m. La diapositiva del área que comprende las pruebas es delimitada "con un marco" (el Marco Génico 21x22mm y resbalones de cubierta - AB1043 CELBIO). 110 μ la l de solución prehibridada es colocada dentro de este área y la diapositiva es cubierta del resbalón de cubierta. La diapositiva con la solución prehibridada es incubada a 42°C durante 2 horas.

25

30

Hibridación:

Una solución que consiste en: 5X el Citrato de Salina de Sodio (SSC), el Sodio del 0.1 % Dodecyl el Sulfato, el 25 % Formamide, 200 μ el ADN de Esperma de Salmón de g, H₂O hasta 2ml está preparado. La solución debe ser filtrada por 0.2 μ filtros de m y precalentada a 42°C. La muestra del ADN amplificado y etiquetado es re suspendido en aproximadamente 110 μ la l de solución h. La muestra de ADN, suspendida de nuevo en la solución hibridada, es desnaturalizada a 95°C. La solución hibridada es colocada en el centro "del marco" que define el área que comprende las sondas objetivo, y el resbalón de cubierta es colocado sobre este área. La diapositiva de ahí es incubada a 42°C durante 16 horas.

35

40

Post-hibridación lavada:

1r LAVADO - en un volumen de 50ml solución: 1x Citrato de Salina de Sodio (SSC), Sodio del 0.1 % Dodecyl Sulfato (SDS) durante 5 minutos a 42°C;
2o LAVADO - en un volumen de 50 solución ml: 0.2x Citrato de Salina de Sodio (SSC), Sodio del 0.1 % Dodecyl Sulfato (SDS) durante 5 minutos a 42°C;
3r LAVADO - en un volumen de 50ml solución: 0.2x Citrato de Salina de Sodio (SSC) durante 5 minutos a 42°C;
4o LAVADO - en un volumen de 50ml solución: 0.2x Citrato de Salina de Sodio (SSC) durante 5 minutos a 42°C.

45

50

La diapositiva ha sido secada por la centrifugación a 800 revoluciones por minuto durante 5 minutos.

BIBLIOGRAFÍA

55 -ANGELINI, E. et al 2001 "Flavescence dorée in France and Italy: occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma." Vitis, 40, 79–86.
-ANGELINI, E. et al 2007 "A new Taqman method for the identification of phytoplasmas associated to grapevine yellows by real time PCR assay." Journal of Microbiological Methods. 6 8, 613-622.
60 -Belli G. et al 1973. "Presenza di una malattia del tipo "Flavescence dorée" in vigneti dell'Oltrepò pavese." Rivista di Patologia Vegetale Ser. IV, 9 (Suppl.): 50-56.

- BIANCO, P.A., et al 2004. "Detection of phytoplasmas associated with grapevine -flavescence dorée disease using real-time PCR". *Journal of Plant Pathology*, 86(3): 257-261.
- BOTTI S. and BERTACCINI A. 2007 Grapevine yellows in Northern Italy: molecular identification of Flavescence Dorée phytoplasma strains and of Bois Noir phytoplasmas. *Journal of applied microbiology*. 103: 2325-2330.
- 5 -BOUDON-PADIEU, E., 2003. The situation of grapevine yellows and current research directions: Distribution, diversity, vectors, diffusion and control. Extended Abstracts 14th Meeting of the ICVG, September 12-17,2003 Locorotondo (Bari), Italy, 47-53.
- CAUDWELL A.,1957. Deux années d'études sur la Flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. *Annales d'Amelioration des Plantes*. 12: 359-393.
- 10 -CREDI, R., 2005. "A multiple real-time PCR assay for the detection of bois noir and grapevine flavescence dorée phytoplasmas" Atti 3 Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmi, Milano, 2005: 130-131.
- FIRRAO, G. et al 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1243-1255.
- 15 -DAVIS, R.E., et al 1997. Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Israel and Greece belong to the stolbur phytoplasma subgroup, 16SrXII-A. *J. Plant Pathol.*79:181-187.
- GALETTO, L., et al 2005. "Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of Flavescence dorée (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field collected plant hosts and insect vectors". *Annals of Applied Biology*. 147, 191-201.
- 20 -GASTEIGER E, et al ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 2003;31(13):3784-3788.
- HREN, M., et al 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology* 56, 785-796.
- KWOK 2001, "Methods for genotyping Single Nucleotide Polymorphisms" *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001. 2:235-58.
- 25 -LEE, I.M., et al, 2000. "Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes" *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, 221-255.
- LEE, I.M., et al. 2004. "Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(337), 347.
- 30 -MAIXNER, M., and W. REINERT. 1999. *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha:Cicadellidae) as a vector of the alder yellows phytoplasma of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Eur. J. Plant. Pathol.* 105:87-94.
- MAIXNER, M., W. REINERT, and H. DARIMONT. 2000. Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis*. 39:83-84.
- 35 -MARTINI M. et al, 2002.- Genetic variability among "flavescence dorée" phytoplasmas from different origins in Italy and France.- *Molecular and Cellular Probes*, 16: 197-203.
- PASQUINI G. et al 2001. Armonizzazione della diagnosi della flavescenza dorata della vite (FD): risultati di una prova comparativa. *Atti Progetto POM A32, vol. II, Locorotondo* 2001, 921-947.
- POLACEK N AND MANKIN AS, 2005 . The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2005 Sep-Oct;40(5):285-311.
- 40 -ŠERUGA MUSIĆ et al 2008 "Distribution of phytoplasma diseases in the Lombardy poplar tree population of Zagreb urban area". *Acta Bot. Croat.* 67 (2), 119-130, 2008.
- WILKINS STEVENS P. et al 2001, "Analysis of single nucleotide polymorphisms with solid phase invasive cleavage reactions". *Nucleic Acids Research.* 2001, Vol. 29, No. 16 e 77.

Lista de secuencias

<110> Unniversità degli studi di Milano

<120> UNA SECUENCIA ESPECÍFICA PARA FLAVESCENCE DOREE PHYTOPLASMA (FD), USOS Y DE LOS MECANISMOS DE DIAGNÓSTICO FD

<130> BW570R

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Phytoplasma sp.

<220>
 <221> allele
 <222> (108)..(108)
 <223> Cuando el nucleótido 107 es C, la secuencia es específica para la Phytoplasmas sp. Asociado con la vid Flavescence Dorée

<220>
 <221> allele
 <222> (171)..(171)
 <223> Cuando el nucleótido 171 es G, la secuencia es específica para la Phytoplasmas sp. Asociado con la vid Flavescence Dorée

<400> 1
 atgattcaag taaataccg tttaaaagta gctgataata gtggtgctaa agaagtttta 60
 gttattaata ttcttggttc aagtaaaaga cgttatgctc aaataggcga tgttgttgta 120
 gtcgctatta aaaaaagtat tccatctgga atggtaaaat caggagaaaa gtctaaagct 180
 ttaattttac gtactaaaaa aggccttagca ggaaaaaatg gttcttatat taaatttgat 240
 gataacgcag tagttattat caaagatgat atgactttaa aagggacaag gatttttgga 300
 cctgtagtta aaaatcaaaa actaaaagat agtaaatttt ctaaatttct ttcttagct 360
 gaaaaagttt ttgtaatatg a 381

<210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Phytoplasma sp.

<400> 2
 tcctggttca agtaaaagac gttatg 26

<210> 3
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Phytoplasma sp.

<220>
 <221> Característica diversa
 <222> (1)..(1)
 <223> marcada con 6-FAM

<400> 3
aataggcgat gttggtg 17

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Phytoplasma sp.

<400> 4
cttttctct gattttacca ttcca 25

<210> 5
<211> 381
<212> DNA
<213> Phytoplasma sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)

<220>
<221> Característica diversa
<222> (10)..(10)
<223> n es G o A

<220>
<221> Característica diversa
<222> (17)..(17)
<223> n es C o G

<220>
<221> Característica diversa
<222> (18)..(18)
<223> n es C o T

<220>
<221> Característica diversa
<222> (108)..(108)
<223> n es C o T

<220>
<221> Característica diversa
<222> (156)..(156)
<223> n es A o G

<220>
<221> Característica diversa
<222> (171)..(171)
<223> n es G o A

<220>
<221> Característica diversa
<222> (246)..(246)
<223> n es C o T

<220>
<221> Característica diversa
<222> (261)..(261)
<223> n es C o T

<220>
<221> Característica diversa
<222> (297)..(297)
<223> n es C o T

<400> 5
atg att caa nta aat ann cgt tta aaa gta gct gat aat agt ggt gct 48
Met Ile Gln Xaa Asn Xaa Arg Leu Lys Val Ala Asp Asn Ser Gly Ala
1 5 10 15
aaa gaa gtt tta gtt att aat att cct ggt tca agt aaa aga cgt tat 96
Lys Glu Val Leu Val Ile Asn Ile Pro Gly Ser Ser Lys Arg Arg Tyr
20 25 30
gct caa ata ggn gat gtt gtt gta gtc gct att aaa aaa agt att cca 144
Ala Gln Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Ile Lys Lys Ser Ile Pro
35 40 45
tct gga atg gtn aaa tca gga gaa aan tct aaa gct tta att tta cgt 192
Ser Gly Met Val Lys Ser Gly Glu Xaa Ser Lys Ala Leu Ile Leu Arg
50 55 60
act aaa aaa ggc tta gca gga aaa aat ggt tct tat att aaa ttt gat 240
Thr Lys Lys Gly Leu Ala Gly Lys Asn Gly Ser Tyr Ile Lys Phe Asp
65 70 75 80
gat aan gca gta gtt att atn aaa gat gat atg act tta aaa ggg aca 288
Asp Xaa Ala Val Val Ile Xaa Lys Asp Asp Met Thr Leu Lys Gly Thr
85 90 95
agg att ttn gga cct gta gtt aaa aat caa aaa cta aaa gat agt aaa 336
Arg Ile Xaa Gly Pro Val Val Lys Asn Gln Lys Leu Lys Asp Ser Lys
100 105 110
ttt tct aaa ttt ctt tct tta gct gaa aaa gtt ttt gta ata tga 381
Phe Ser Lys Phe Leu Ser Leu Ala Glu Lys Val Phe Val Ile
115 120 125

<210> 6
<211> 126
<212> PRT
<213> Phytoplasma sp.

<220>
<221> Característica diversa
<222> (4)..(4)
<223> El 'Xaa' en la posición 4 significa Ile, Val, o Leu.

<220>
<221> Característica diversa
<222> (6)..(6)
<223> El 'Xaa' en la posición 6 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, o Met.

<220>
<221> Característica diversa
<222> (57)..(57)
<223> El 'Xaa' en la posición 57 representa Lys, o Asn.

<220>
<221> Característica diversa
<222> (82)..(82)
<223> El 'Xaa' en la posición 82 significa Lys, o Asn.

<220>
<221> Característica diversa
<222> (87)..(87)
<223> El 'Xaa' en la posición 87 representa Ile, o Met.

<220>
<221> Característica diversa

<222> (99)..(99)

<223> El 'Xaa' en la ubicación 99 significa Leu, o Phe.

<400> 6

Met Ile Gln Xaa Asn Xaa Arg Leu Lys Val Ala Asp Asn Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Lys Glu Val Leu Val Ile Asn Ile Pro Gly Ser Ser Lys Arg Arg Tyr
 20 25 30
 Ala Gln Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Ile Lys Lys Ser Ile Pro
 35 40 45
 Ser Gly Met Val Lys Ser Gly Glu Xaa Ser Lys Ala Leu Ile Leu Arg
 50 55 60
 Thr Lys Lys Gly Leu Ala Gly Lys Asn Gly Ser Tyr Ile Lys Phe Asp
 65 70 75 80
 Asp Xaa Ala Val Val Ile Xaa Lys Asp Asp Met Thr Leu Lys Gly Thr
 85 90 95
 Arg Ile Xaa Gly Pro Val Val Lys Asn Gln Lys Leu Lys Asp Ser Lys
 100 105 110
 Phe Ser Lys Phe Leu Ser Leu Ala Glu Lys Val Phe Val Ile
 115 120 125

<210> 7

<211> 126

<212> PRT

<213> Phytoplasma sp. Cepa asociada FD

<400> 2

Met Ile Gln Val Asn Thr Arg Leu Lys Val Ala Asp Asn Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Lys Glu Val Leu Val Ile Asn Ile Pro Gly Ser Ser Lys Arg Arg Tyr
 20 25 30
 Ala Gln Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Ile Lys Lys Ser Ile Pro
 35 40 45
 Ser Gly Met Val Lys Ser Gly Glu Lys Ser Lys Ala Leu Ile Leu Arg
 50 55 60
 Thr Lys Lys Gly Leu Ala Gly Lys Asn Gly Ser Tyr Ile Lys Phe Asp
 65 70 75 80
 Asp Asn Ala Val Val Ile Ile Lys Asp Asp Met Thr Leu Lys Gly Thr
 85 90 95

ES 2 627 665 T3

Arg Ile Phe Gly Pro val val Lys Asn Gln Lys Leu Lys Asp Ser Lys
100 105 110

Phe Ser Lys Phe Leu Ser Leu Ala Glu Lys val Phe val Ile
115 120 125

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico de la enfermedad Flavescencia dorada de la vid, que comprende la etapa de
 - a) identificar uno o ambos de los nucleótidos en las posiciones 108 y 171 de SEQ ID NO 5, y/o sus nucleótidos complementarios en la secuencia complementaria a SEQ ID NO: 5, en una muestra vegetal que comprende floema;
- 5 en el que la presencia de un resto C en la posición 108 de SEQ ID NO 5, y/o de un resto G en su nucleótido complementario en la secuencia complementaria a SEQ ID NO 5, y/o de un resto G en la posición 171 de SEQ ID NO 5, y/o de un resto C en su nucleótido complementario, indica la presencia en la muestra de al menos una de las cepas de fitoplasma asociadas con la enfermedad Flavescencia dorada de la vid.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la identificación de la etapa a) comprende una primera etapa en la que se lleva a cabo una PCR, PCR en tiempo real, Ligamiento, Hibridación Específica de Alelos, extensión de cebadores, escisión invasiva o reacción de secuenciación, y una segunda etapa en la que el producto obtenido en la primera etapa se detecta supervisando la luz emitida por dicho producto, o midiendo la masa de dichos productos, o supervisando la radiactividad emitida por dicho producto, o secuenciando dicho producto.
- 15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha supervisión de la emisión de luz se lleva a cabo supervisando la fluorescencia, luminiscencia, fluorescencia resuelta en el tiempo, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o polarización de fluorescencia, dicha medición de la masa se lleva a cabo por espectrometría de masas o análisis de heterodúplex, y dicha supervisión de la radiactividad se lleva a cabo con herramientas sensibles a la radiactividad.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho método se realiza en formato de fase sólida tal como micromatriz o microplaca.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha identificación se lleva a cabo con una RT PCR usando un cebador directo de SEQ ID NO 2, una sonda específica de alelo de SEQ ID NO 3 y un cebador inverso de SEQ ID NO 4.
- 25 6. Un kit para el diagnóstico de la enfermedad Flavescencia dorada de la vid, que comprende reactivos para la identificación de los nucleótidos en las posiciones 108 y 171 de SEQ ID NO 5 o 1 y/o sus nucleótidos complementarios en la secuencia complementaria a SEQ ID NO 5 o 1 en un floema de planta de la vid.
- 30 7. El kit de la reivindicación 6, que comprende además soportes sólidos en los que se anclan oligonucleótidos para la identificación de uno o ambos de los nucleótidos en las posiciones 108 y 171 de SEQ ID NO 5 o 1 y/o uno o ambos de sus nucleótidos complementarios en la secuencia complementaria a SEQ ID NO 5 o 1 en posiciones conocidas en dicho soporte en una o más copias por posición.
8. El kit de la reivindicación 7, que comprende además sondas y/u oligonucleótidos marcados, correspondientes y/o complementarios a una región cadena arriba y/o cadena abajo de uno o ambos de los nucleótidos en las posiciones 108 y 171 de SEQ ID NO 5 o 1 y/o que solapan una región que comprende uno o ambos de los nucleótidos en las posiciones 108 y 171 de SEQ ID NO 5 o 1.
- 35 9. El kit de la reivindicación 8 en el que una o más de dichas sondas y/o dichos oligonucleótidos están marcados.
10. Una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 1, codificando dicha secuencia el gen de rpl14 (381 pb) específico de fitoplasma relacionado con la FD.

ES 2 627 665 T3

```

FDC      ATGATTCAAGTAAATACCCGTTTAAAAGTAGCTGATAATAGTGGTGCTAAAGAAGTTTTA 60
FD92     ATGATTCAAGTAAATACCCGTTTAAAAGTAGCTGATAATAGTGGTGCTAAAGAAGTTTTA 60
FD70     ATGATTCAAGTAAATACCCGTTTAAAAGTAGCTGATAATAGTGGTGCTAAAGAAGTTTTA 60
ALY      ATGATTCAAGTAAATAGCCGTTTAAAAGTAGCTGATAATAGTGGTGCTAAAGAAGTTTTA 60
EY       ATGATTCAAATAAATAGTCGTTTAAAAGTAGCTGATAATAGTGGTGCTAAAGAAGTTTTA 60
ULW      ATGATTCAAATAAATAGTCGTTTAAAAGTAGCTGATAATAGTGGTGCTAAAGAAGTTTTA 60
*****.*****.*****

FDC      GTTATTAATATTCCTGGTTCAAGTAAAAGACGTTATGCTCAAATAGGCGATGTTGTTGTA 120
FD92     GTTATTAATATTCCTGGTTCAAGTAAAAGACGTTATGCTCAAATAGGCGATGTTGTTGTA 120
FD70     GTTATTAATATTCCTGGTTCAAGTAAAAGACGTTATGCTCAAATAGGCGATGTTGTTGTA 120
ALY      GTTATTAATATTCCTGGTTCAAGTAAAAGACGTTATGCTCAAATAGGCGATGTTGTTGTA 120
EY       GTTATTAATATTCCTGGTTCAAGTAAAAGACGTTATGCTCAAATAGGCGATGTTGTTGTA 120
ULW      GTTATTAATATTCCTGGTTCAAGTAAAAGACGTTATGCTCAAATAGGCGATGTTGTTGTA 120
*****.*****.*****

FDC      GTCGCTATTAAAAAAAGTATTCATCTGGAATGGTAAAATCAGGAGAAAAGTCTAAAGCT 180
FD92     GTCGCTATTAAAAAAAGTATTCATCTGGAATGGTAAAATCAGGAGAAAAGTCTAAAGCT 180
FD70     GTCGCTATTAAAAAAAGTATTCATCTGGAATGGTAAAATCAGGAGAAAAGTCTAAAGCT 180
ALY      GTCGCTATTAAAAAAAGTATTCATCTGGAATGGTAAAATCAGGAGAAAATCTAAAGCT 180
EY       GTCGCTATTAAAAAAAGTATTCATCTGGAATGGTAAAATCAGGAGAAAATCTAAAGCT 180
ULW      GTCGCTATTAAAAAAAGTATTCATCTGGAATGGTAAAATCAGGAGAAAATCTAAAGCT 180
*****.*****.*****

FDC      TTAATTTTACGTACTAAAAAGGCTTAGCAGGAAAAAATGGTTCCTATATTAATTTGAT 240
FD92     TTAATTTTACGTACTAAAAAGGCTTAGCAGGAAAAAATGGTTCCTATATTAATTTGAT 240
FD70     TTAATTTTACGTACTAAAAAGGCTTAGCAGGAAAAAATGGTTCCTATATTAATTTGAT 240
ALY      TTAATTTTACGTACTAAAAAGGCTTAGCAGGAAAAAATGGTTCCTATATTAATTTGAT 240
EY       TTAATTTTACGTACTAAAAAGGCTTAGCAGGAAAAAATGGTTCCTATATTAATTTGAT 240
ULW      TTAATTTTACGTACTAAAAAGGCTTAGCAGGAAAAAATGGTTCCTATATTAATTTGAT 240
*****.*****.*****

FDC      GATAACGCAGTAGTTATTATCAAGATGATATGACTTTAAAAGGGACAAGGATTTTGGGA 300
FD92     GATAACGCAGTAGTTATTATCAAGATGATATGACTTTAAAAGGGACAAGGATTTTGGGA 300
FD70     GATAACGCAGTAGTTATTATCAAGATGATATGACTTTAAAAGGGACAAGGATTTTGGGA 300
ALY      GATAACGCAGTAGTTATTATCAAGATGATATGACTTTAAAAGGGACAAGGATTTTGGGA 300
EY       GATAATGCAGTAGTTATTATTAAGATGATATGACTTTAAAAGGGACAAGGATTTTCGGA 300
ULW      GATAATGCAGTAGTTATTATTAAGATGATATGACTTTAAAAGGGACAAGGATTTTCGGA 300
*****.*****.*****

FDC      CCTGTAGTTAAAAATCAAAAACATAAAGATAGTAAATTTCTAAATTTCTTTCTTAGCT 360
FD92     CCTGTAGTTAAAAATCAAAAACATAAAGATAGTAAATTTCTAAATTTCTTTCTTAGCT 360
FD70     CCTGTAGTTAAAAATCAAAAACATAAAGATAGTAAATTTCTAAATTTCTTTCTTAGCT 360
ALY      CCTGTAGTTAAAAATCAAAAACATAAAGATAGTAAATTTCTAAATTTCTTTCTTAGCT 360
EY       CCTGTAGTTAAAAATCAAAAACATAAAGATAGTAAATTTCTAAATTTCTTTCTTAGCT 360
ULW      CCTGTAGTTAAAAATCAAAAACATAAAGATAGTAAATTTCTAAATTTCTTTCTTAGCT 360
*****.*****.*****

FDC      GAAAAAGTTTTTGTAAATATGA 381
FD92     GAAAAAGTTTTTGTAAATATGA 381
FD70     GAAAAAGTTTTTGTAAATATGA 381
ALY      GAAAAAGTTTTTGTAAATATGA 381
EY       GAAAAAGTTTTTGTAAATATGA 381
ULW      GAAAAAGTTTTTGTAAATATGA 381
*****.*****.*****

```

Fig 1

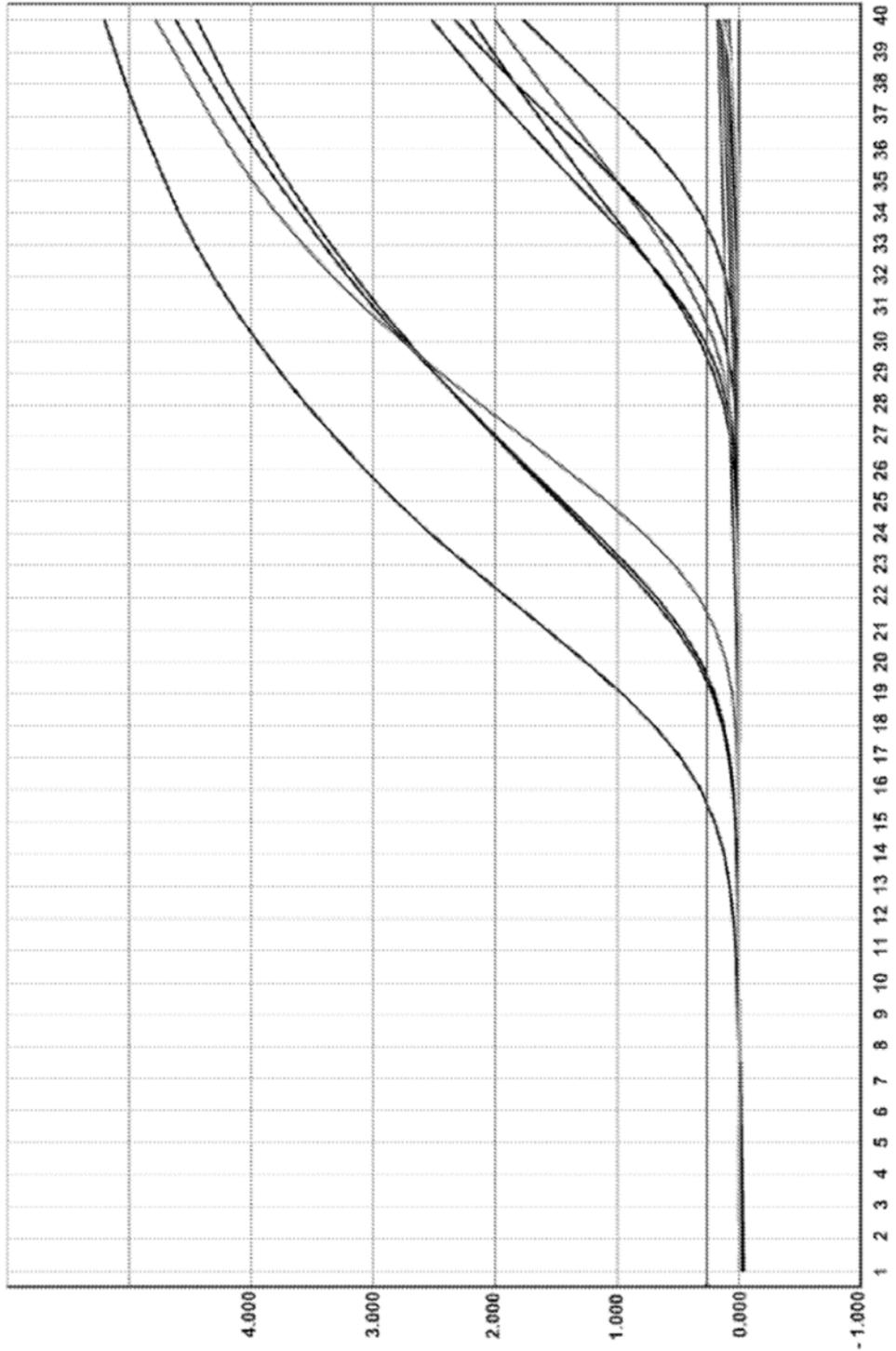


Fig 2