

TÍTULO DE PATENTE NO. 339891

Titular(es): CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C.
Domicilio: Calle 43 #130, Col. Chuburná de Hidalgo, Merida, 97200, Yucatán, MÉXICO
Denominación: MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DEL FITOPLASMA CAUSANTE DEL AMARILLAMIENTO LETAL EN COCOTERO Y ESTUCHE DE REACTIVOS PARA ELLO
Clasificación: Int.Cl.8: C12N15/00; C12N15/11; C12Q1/00; C12Q1/04; C12Q1/68
Inventor(es): LUIS SAENZ CARBONELL; IVÁN CÓRDOVA LARA; CARLOS OROPEZA SALÍN

SOLICITUD

Número:	Fecha de presentación:	Hora:
MX/a/2010/013507	9 de diciembre de 2010	10:04

PRIORIDAD

País:	Fecha:	Número:
--------------	---------------	----------------

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 9 de diciembre de 2030

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

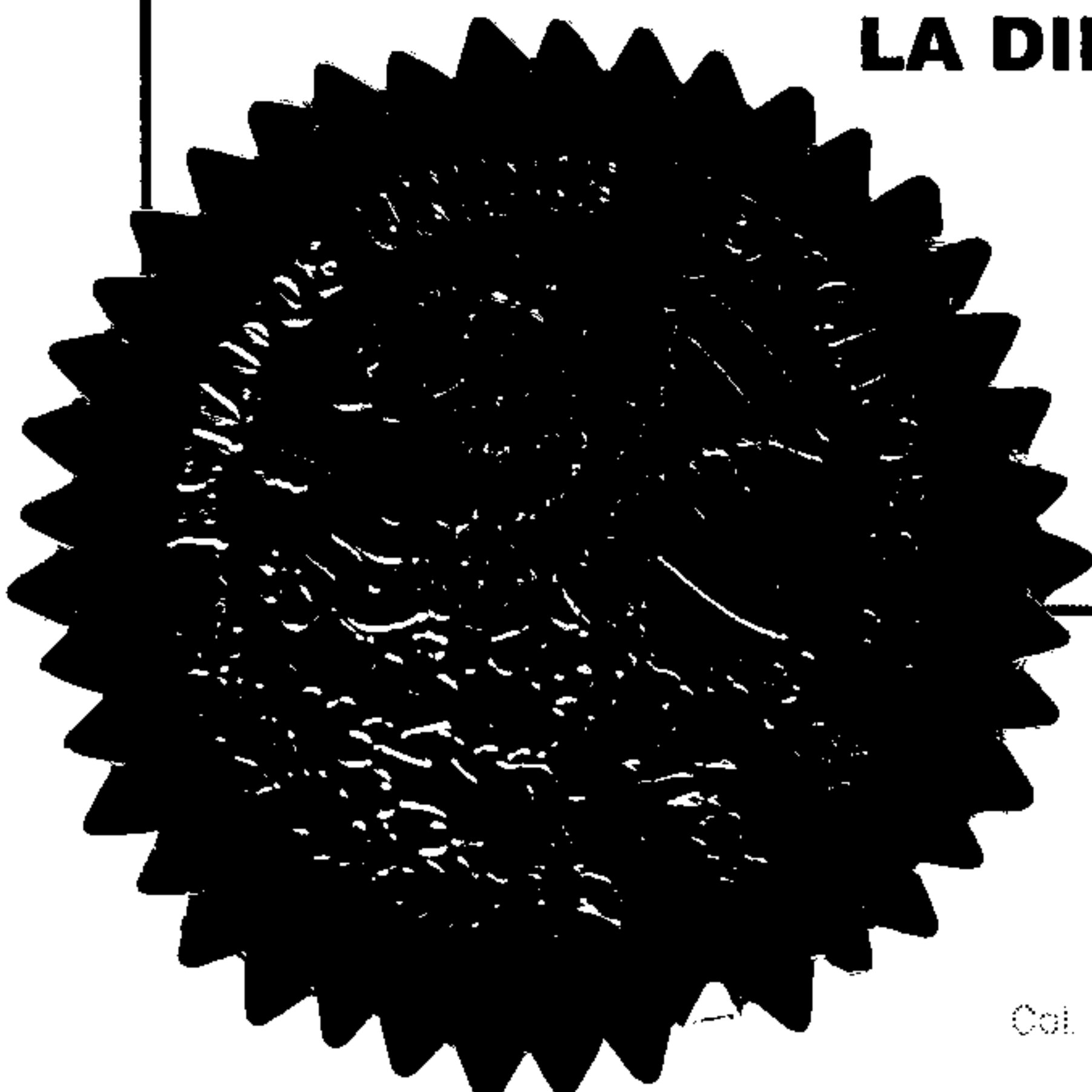
De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 31 de mayo de 2016

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES

NAHANNY CANAL REYES



**MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DEL FITOPLASMA CAUSANTE
DEL AMARILLAMIENTO LETAL EN COCOTERO Y ESTUCHE DE
REACTIVOS PARA ELLO**

5

ANTECEDENTES.

1. Campo de la invención.

La presente invención se refiere a un método para la detección del amarillamiento
letal de plantas, y más particularmente a un método basado en PCR tiempo real
10 para dicho fin, utilizando oligos y una sonda específica para la detección del
amarillamiento letal en plantas, en particular en cocotero (*Cocos nucifera L.*).

2. Antecedentes generales de la invención.

15 El amarillamiento letal (AL) es una de las principales enfermedades que afecta
las plantaciones comerciales del cocotero en el continente americano. El agente
causal es un fitoplasma perteneciente al clado IV de este grupo y se le ha
sugerido el nombre de '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma palmae*'. La técnica actual
de detección del patógeno es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
20 anidada, sin embargo es una técnica laboriosa, tardada y que emplea el uso de
sustancias peligrosas para el ser humano.

El amarillamiento letal es una enfermedad devastadora del cocotero y otras
palmas y hasta el momento no existe un control efectivo. El '*Ca. Phytoplasma*
25 *palmae*' es aceptado como el agente causal del amarillamiento letal en cocotero
(Harrison y Oropeza, 2008). Esta enfermedad amenaza la producción de coco de
las plantaciones afectadas porque aniquila las palmas rápidamente (6 meses) y
no hay cura (Eden-Green, 1997). Además del cocotero, afecta a por lo menos 35
especies de palmas, entre las que destacan: *Adonidia merrillii* ; *Aiphanes lindeniana*;
30 *Allagoptera arenaria*; *Arenga engleri*; *Borassus flabellifer*; *Caryota mitis*;

Caryota rumphiana; Chelyocarpus chuco; Cocos nucifera; Crotalaria retusa; Crysophila warsecewiczii; Cyphophoenix nucele Dictyosperma álbum; Dypsis cabadae; Dypsis decaryi; Gaussia attenuata; Howea belmoreana; Howea forsteriana; Hyophorbe verschaffeltii ; Latania lontaroides; Livistona chinensis; Livistona rotundifolia; Nannorrhops ritchiana ; Phoenix canariensis; Phoenix dactylifera; Phoenix reclinata. ; Phoenix rupicola; Phoenix sylvestris; Pritchardia affinis; Pritchardia pacifica ; Pritchardia remota; Pritchardia thurstonii; Ravenea hildebrandtii; Syagrus schizophylla; Trachycarpus fortune y Veitchia arecina. (Harrison y Oropeza, 2008).

10

Los fitoplasmas (previamente conocidos como organismos tipo micoplasma) son bacterias carentes de pared celular pertenecientes a la clase *Mollicutes* que no han podido ser cultivadas in vitro (Harrison y Oropeza, 2008). Colonizan el floema de plantas y también son parásitos de insectos chupadores de savia en donde adquieren y los transmiten durante su alimentación (Weintraub y Beanland, 2006). Los grupos y subgrupos de fitoplasmas han sido clasificados por su análisis filogenético de los genes 16S ribosomales (Gundersen *et al*, 1994; Lee *et al*, 2000) y es la base de taxonomía formal de los fitoplasmas (IRPCM, 2004). El clado de los fitoplasma ha sido dividido en 32 subclados (especies putativas) de los cuales se han asignado nombre de especies en estatus provisional de "Candidatus" (IRPCM, 2004). El 'Ca *Phytoplasma palmae*' causante del AL que se encuentra clasificado en el subclado vii (Gundersen *et al*, 1994) se le ha sugerido el nombre de 'Ca. *Phytoplasma palmae*' (IRPCM, 2004),

20

25

Entre las técnicas usadas para detectar la presencia del 'Ca. *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal se encuentra la sintomatología, respuesta diferencial a antibióticos y microscopía electrónica. Las dos primeras no son específicas y la última es muy laboriosa. En el caso de fitoplasmas, las técnicas moleculares son de particular relevancia si consideramos que estos patógenos no se han podido cultivar en medios nutritivos y además generalmente están presentes en concentraciones muy bajas, lo que dificulta seriamente su detección

30



(Dollet, 1977). La técnica actual de detección de fitoplasmas particular para el 'Ca. *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en su versión ~~denominada anidada~~ que consiste en dos pasos de amplificación del ADN del operon ribosomal. En particular para la detección del 'Ca. *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal, en la primera ronda de amplificación se utilizan oligonucleótidos universales P1 (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (Smart *et al.*, 1996), en la segunda ronda se utilizan oligonucleótidos específicos del grupo donde pertenecen el fitoplasma causante del amarillamiento letal. Este par de oligonucleótidos es denominados 503f/LY16Sr (Harrison *et al.* 1999). El producto de la reacciones de PCR es visualizado en un gel de agarosa que es teñido con bromuro de etidio.

Esta técnica es lo suficientemente sensible para detectar a los patógenos al inicio de los síntomas de la enfermedad del AL (Harrison y Oropeza, 2008), sin embargo presenta algunas desventajas tales como: toma mucho tiempo ya que involucra dos rondas de amplificación del ADN, por esta razón también es muy laboriosa. Además tiene el inconveniente de presentar falsos positivos e involucra también el uso de productos tóxicos como el bromuro de etidio

SUMARIO DE LA INVENCION

Un primer objeto de la invención consiste en proporcionar un método para la detección en tiempo real del fitoplasma causante del amarillamiento letal en plantas.

Un segundo objeto de la invención consiste en proporcionar un método que permita la detección temprana del fitoplasma causante del amarillamiento letal en plantas.

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un método altamente selectivo para la detección del fitoplasma causante del amarillamiento letal en plantas.

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un método seguro, sin el empleo de materiales tóxicos para llevar a cabo la detección del fitoplasma

causante del amarillamiento letal en plantas.

Aún otro objeto de la invención consiste en proporcionar oligonucleótidos sentido, antisentido y sonda para la detección por PCR en tiempo real del fitoplasma causante del amarillamiento letal en plantas.

5 Los anteriores objetos se alcanzan por medio de proporcionar un método, oligos y kit para la detección del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en plantas, que comprende las etapas de (a) obtener una muestra biológica de la planta; (b) aislar ADN de dicha muestra de la planta, (c) amplificar mediante PCR en tiempo real con un juego de oligonucleótidos que
10 comprende, un oligonucleótido sentido que consiste de la secuencia 5'-GCTAAAGTCCCCACCATAACGT-3' (SEQ ID NO. 1) y un oligonucleótido antisentido que consiste de la secuencia 5'-CGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGT-3' (SEQ ID NO. 2), y con una sonda que consiste de la secuencia 5'-CCCCTGTCGTTAATTG-3' (SEQ ID NO. 3); (d) detectar la fluorescencia emitida
15 por la sonda durante cada ciclo de amplificación mediante PCR en tiempo real, y (e) determinar la presencia del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en plantas, en donde la cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en plantas.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra una gráfica de detección del '*Ca. Phytoplasma palmae*' por PCR en tiempo real en extractos de ADN de palmas de cocotero.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El desarrollo de la tecnología de PCR en tiempo real ha resultado en un ensayo de detección confiable. Esta tecnología está basada en el uso de una sonda
30 marcada con un fluoróforo, y es específica para una secuencia blanco y dos oligonucleótidos. Conforme los oligonucleótidos se unen y son extendidos a lo

largo de la secuencia blanco, la actividad de exonucleasa 5' de la ADN polimerasa hidroliza a la sonda y libera al fluoróforo emitiendo fluorescencia. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado. Esta tecnología confiere una alta especificidad (debido a que no solo requiere de dos oligonucleótidos, sino también de una sonda que debe unir a su blanco), es más precisa y típicamente más sensible que el PCR convencional.

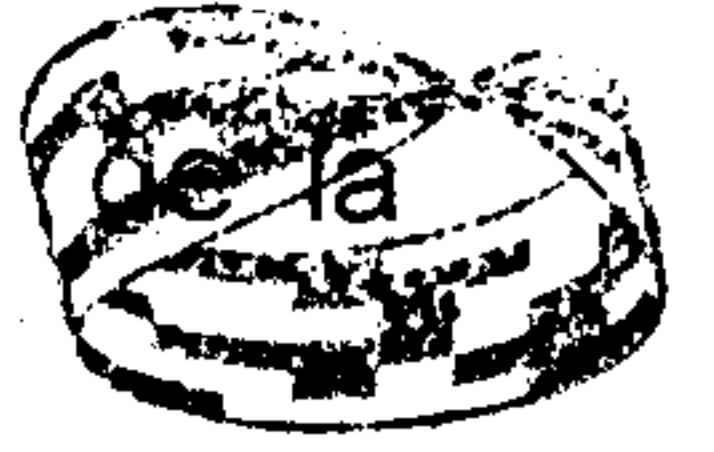
La PCR en tiempo real (PCR tr) es una técnica actual de investigación que utiliza secuencias de ADN diseñadas específicamente (dos oligonucleótidos y una sonda fluorescente) para detectar y cuantificar blancos de ADN. La sonda contiene un reportero fluorescente en un extremo y un apagador en el otro. Durante cada ciclo de amplificación, la sonda se une al ADN blanco, seguido de la unión de los oligonucleótidos sentido y antisentido. Conforme la hebra de ADN es copiada, el reportero es liberado de la sonda y emite una señal de fluorescencia la cual es detectada por el equipo de PCR en tiempo real. La cantidad de fluorescencia se incrementa con cada ciclo de PCR proporcionalmente a la cantidad de ADN blanco. Esto resulta en la detección y cuantificación del DNA blanco con un alto grado de especificidad (no hay falsos positivos), precisión y sensibilidad.

La presente invención describe el uso de un juego de oligonucleótidos y sonda que son específicos para la detección del '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal con la tecnología de PCR en tiempo real. La especificidad de los oligonucleótidos y sondas fueron evaluadas con 12 extractos de ADN de plantas infectadas, cepas de fitoplasmas de: '*Ca. Phytoplasma ulmi*', Viriscencia mexicana de la vicaria, Petalo-verde de la fresa, '*Ca. Phytoplasma ziziphi*', Durazno del oeste X, '*Ca. Phytoplasma cocostanzaniae*', '*Ca. Phytoplasma cynodontis*', Amarillamiento del fresno, Escoba de bruja del gandul y '*Ca. Phytoplasma palmae*' (aislado de Florida, Yucatán y Republica dominicana). La mayoría de los extractos de ADN provenian de plantas infectadas de *Catharanthus roseus* a excepción del '*Ca. Phytoplasma palmae*' y '*Ca. Phytoplasma Cocostanzaniae*' que provenía de extractos de palmas de cocotero.

La detección temprana, rápida sensible del '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal es importante para evitar la dispersión rápida de la enfermedad así como para identificar paimas resistentes y tolerantes a la enfermedad. Por lo tanto se desarrolló un método basado en PCR en tiempo real para la detección rápida, precisa y sensible del '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal. Específicamente se probaron cuatro ensayos para validar esta metodología 1) especificidad de las secuencias blanco comparada con otras secuencias relacionadas, 2) análisis comparativo entre las técnicas de PCR anidado y tiempo real, 3) detección del patógeno en palmas de cocotero con síntomas típicos del amarillamiento letal, 4) detección del patógeno en embriones de semillas de cocotero provenientes de palmas infectadas con el '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal. En todos los casos se comparó con la técnica PCR anidado.

La presente invención reclama un método y un kit para la detección del '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal del cocotero y sus componentes. El kit consiste de una sonda específica para el gen 16S ribosomal del patógeno así como oligonucleótidos específicos para estos genes. El método describe el proceso para amplificar ADN de palma de cocotero que se utiliza como molde para llevar a cabo el proceso de PCR en tiempo real, el cual involucra la detección por medio de fluorescencia usando el método y kit descrito en la presente invención. Si la señal de fluorescencia se incrementa en el proceso de PCR, la planta está infectada con el '*Ca. Phytoplasma palmae*' del amarillamiento letal. Los datos experimentales presentados demuestran que la sensibilidad del método es mayor que la del método tradicional que se basa en la PCR anidada y la detección por electroforesis. Además, el método descrito en la presente patente ofrece las siguientes ventajas con respecto al método tradicional: mayor rapidez y menor riesgo de falsos positivos ya que involucra una sola ronda de PCR y no requiere un manejo después de la reacción de PCR, análisis de grandes cantidades de muestra debido a la sencillez de su operación. Además, la metodo-

logía propuesta es amigable con el medio ambiente ya que la metodología tradicional no involucra el uso de sustancias tóxicas.



Los oligonucleótidos y la sonda específica para el 'Ca *Phytoplasma palmae*'
5 causante del amarillamiento letal fueron diseñados a partir de una secuencia
específica de la región 16S ribosomal del 'Ca. *Phytoplasma palmae*' causante del
amarillamiento letal (número de accesoión Genbank, AF498309) (Narvaez et al,
2005), la cual fue alineada con otras secuencias 16S ribosomales de otras cepas
de fitoplasmas relacionadas, se diseñó la secuencia de los oligonucleótidos y de
10 la sonda en las regiones donde de la secuencias que no presentabas homología
con la región 16S ribosomal del 'Ca. *Phytoplasma palmae*' causante del amari-
llamiento letal (número de accesoión Genbank, AF498309), usando el programa
primer express de Applied biosystems, (Foster, City, California, EUA). La sonda
esta marcado en el extremo 5' con el flouorforo 6-carboxifluoresceina (FAM) y en
15 el extremo 3' terminal con un apagador no fluorescente (NFQ).

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos y sonda dual marcada para la detección específica del 'Ca *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal del cocotero

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Región amplificada
Secuencia Sentido (SEQ ID NO. 1)	GCTAAAGTCCCCACCATAACGT	
Secuencia Antisentido (SEQ ID NO. 2)	CGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGT	16S rRNA
Sonda (SEQ ID NO. 3)	FAM-CCCCTGTCGTTAATTG-NFQ	

20 dichos oligonucleótidos hibridan específicamente con la región (265-287 y 323-
348) dirección 5'-3' de la secuencia del gen 16S ribosomal del microorganismo
patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en plantas (número de
accesoión Genbank, AGF498309 (o con su complemento). La sonda hibrida en la
región (291-307) en dirección 5'-3' de la región de la secuencia del gen 16S
25 ribosomal del microorganismo patógeno. El tamaño del amplicón es de 83 pares

de bases.

Selección de temperatura de alineación-extensión.



El primer paso para establecer la metodología de PCR en tiempo real fue
5 determinar la temperatura óptima de alineación-extensión. Por lo tanto, se
probaron varias temperaturas que de acuerdo a la literatura (Christensen *et al.*,
2004) que podrían ser las más adecuadas para el uso de sondas duales. Los
resultados mostraron que la temperatura óptima fue de 61°C. Las reacciones de
PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo en un volumen final de 20 µL que
10 contenía 25 ng de ADN. Se utilizó el amortiguador TaqMan Universal PCR master
mix (Applied Biosystems), 1µL de la mezcla de los cebadores (900 nM) 5'-
GCTAAAGTCCCCACCATAACGT-3' Secuencia sentido (SEQ ID NO. 1) y 5'-
CGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGT-3' (SEQ ID NO. 2) (900 nM) secuencia
antisentido y sonda 5'-CCCCTGTCGTTAATTG-3' (SEQ ID NO. 3) (250 nM). La
15 amplificación y la detección se obtuvo al utilizar el termociclador de PCR en
tiempo real CFX96 (BIO-RAD, EUA). Se utilizó el siguiente programa: 2 min a
50°C para activar la AmpErase UNG (Applied Biosystems) la cual previene la
amplificación de de ADN previamente amplificado, 10 min a 95 °C seguido de 35
ciclos 15 s at 95 °C y 60 s a tres diferentes temperaturas: 60, 61 y 62 °C para la
20 alineación-extensión. A la temperatura de 61°C se obtuvo un ciclo umbral (Ct por
sus siglas en inglés) que es definido como el ciclo al cual la fluorescencia
generada por la muestra es mayor que el ruido de fondo, de 18.5, menor que las
obtenidas con las temperaturas de 60°C y 62°C (Ct 20.9 y 24.3 respectivamente),
además de presentar altos valores de unidades relativas de fluorescencia, lo que
25 indica que la amplificación fue más eficiente a esa temperatura.

Especificidad de los oligonucleótidos y sonda

Para determinar la especificidad de los oligonucleótidos y sonda para la detección
30 del '*Ca Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal del cocotero se
utilizó el ADN de plantas infectadas con 11 cepas de fitoplasmas que fueron

utilizados como plantillas utilizando los oligonucleótidos y sonda de la presente invención.



Para validar la especificidad de los iniciadores diseñados, el producto de amplifi-
5 cación obtenido con este juego de iniciadores fue purificado y secuenciado en la
Universidad de Davis (Davis sequencing) (Estados Unidos de América). Las
secuencias obtenidas fueron alineadas con la base de datos del GenBank™
usando el programa BLAST™ (Altschul et al., 1997) obteniéndose en todos los
casos un 100% de identidad con las especies reportadas como '*Candidatus (Ca.)*
10 *Phytoplasma palmae*', lo cual valida la especificidad de estos iniciadores.

La reacción de PCR anidado para análisis comparativo consistió en dos rondas de
amplificación. A la primera ronda se adicionó un par de cebadores universales
P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991; Smart et al. 1996). Las condiciones de amplificación
15 fueron: desnaturalización por 60 s a 94 °C; 35 ciclos de alineamiento a 54 °C por
50 s y extensión a 72 °C durante 80 s (10 min para la extensión final). En la
segunda ronda de amplificación se utilizó como molde de ADN una dilución 1:40
del producto de amplificación de la primera ronda en agua destilada estéril
utilizando un par de cebadores generales R16f2/R16r2 (Lee et al. 1993). Para la
20 reacción de anidado los siguientes parámetros fueron utilizados: denaturalización
por 30 s a 94 °C; 35 ciclos de alineamiento a 60 °C por 50 s y extensión a 72 °C
durante 80 s (10 min para la extensión final). En todos los ensayos de PCR se
incluyeron el control positivo que consistió en ADN de una palma infectada y el
control negativo que es ADN de palma sana. En ambos casos de amplificación se
25 utilizó una unidad de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, E.U), Amortiguador
SuperMix (Invitrogen), 200 nM de cada cebador, 200 μM de dNTPs y 1.5 mM de
MgCl₂. Al final de la segunda reacción se tomó una alícuota de (10 μl) de las
muestras amplificadas y se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa, el cual
se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un tras iluminador de UV. Los geles
30 fueron fotografiados con una cámara KODAK utilizando el programa EDAS™.
Las reacciones de PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo en un volumen final



de 20 μ L que contenía 25 ng de ADN. Se utilizó el **Amplificador** Universal PCR master mix (Applied Biosystems), 1 μ L de cebadores (900 nM) 5'-GCTAAAGTCCCCACCATAACGT-3' Secuencia sentido (SEQ ID NO. 1) y 5'- CGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGT-3' (900 nM) **secuencia antisentido** (SEQ ID NO. 2) y (250 nM) sonda 5'-CCCCTGTCGTTAATTG-3' (SEQ ID NO. 3). La amplificación y la detección se obtuvieron al utilizar el termociclador de PCR en tiempo real CFX96 (BIO-RAD™, EUA). Se utilizó el siguiente programa: 2 min a 50°C para activar la AmpErase UNG (Applied Biosystems) la cual previene la amplificación de de ADN previamente amplificado, 10 min a 95 °C seguido de 35 ciclos 15 s a 95 °C y 60 s a 61 °C para la alineación-extensión (Tabla 2).

Tabla 2. Perfil térmico.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 s	35
61	60 s	

El fluoróforo reportero de la sonda es hidrolizada en cada ciclo de la reacción de PCR, el cual al ser excitado por una longitud de onda que emite el aparato a 494 nm emite una fluorescencia, medida como unidades relativa de fluorescencia, a 530 nm. La lectura de la fluorescencia se realizó a 60°C durante 1 minuto después de cada paso de alineación-extensión.

Análisis comparativo entre las técnicas de PCR anidado y tiempo real

Para la determinación de la presencia del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en plantas por PCR en tiempo real se utilizó la opción de "análisis de punto final" contenido en el programa del termociclador de PCR en tiempo real. Las muestras positivas tienen un valor de unidades relativas de fluorescencia mayor que los controles negativos (agua y ADN de palma sana).



Tabla 3. Detección de diferentes aislados de fitoplasmas y los resultados de detección por PCR anidado y PCR en Tiempo Real utilizando la sonda y los oligonucleótidos de la presente invención.

Cepa de fitoplasma	PCR usando oligonucleótidos P1/P7- R16f2/R16r2	PCR en tiempo real
Ca. <i>Phytoplasma ulmi</i> . Amarillamiento del olmo (Elm Yellow, EY)	+	-
Viriscencia mexicana de la vicaria (Mexican Periwinkle virescence, MPV)	+	-
Petalo-verde de la fresa (Strawberry green-petal, SGP)	+	-
Ca. <i>Phytoplasma ziziphi</i> . Jajubi escoba de bruja (Jujube witches's broom, JMB)	+	-
Durazno del oeste X (Peach western X, PWX)	+	-
Ca. <i>Phytoplasma cocostanzaniae</i> . Declinamiento letal de Tanzania (Tanzania lethal decline coconut, TLD)	+	-
Ca. <i>Phytoplasma cynodontis</i> . Hoja blanca de pasto Bermuda (Bermuda grass white leaf, BGWL).	+	-
Amarillamiento del fresno (Ash Yellows, ASHY)	+	-
Escoba de bruja del gandul (Pigeon pea witches's broom, PPWB)	+	-
'Ca. <i>Phytoplasma palmae</i> . 'Amarillamiento letal del cocotero, LY, aislado Florida, E.U.)	+	+
'Ca. <i>Phytoplasma palmae</i> ' Amarillamiento letal del cocotero, LY, aislado, Yucatán, Mexico)	+	+
'Ca. <i>Phytoplasma palmae</i> '. Amarillamiento letal del cocotero, LY, Aislado Republica Dominicana)	+	+
Palma de cocotero sana	-	-



Las muestras con ADN del '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal fueron detectadas como positivas por ambas técnicas. Las otras cepas de fitoplasma presentaron una fluorescencia similar a los ~~controles negativos~~ Tabla 3). Estos resultados muestran la alta especificidad de los oligonucleótidos y sonda descritos en la presente invención.

Se realizó la comparación entre las dos técnicas utilizando diluciones de ADN con concentraciones conocidas con muestras de diez palmas infectadas con el '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal. Para la extracción total del ADN de cocotero se utilizó 1 gramo de material biológico.

La muestra biológica se seleccionó de embriones, semillas, hojas, inflorescencias, tallos o tronco, raíces y combinaciones de las mismas de planta sospechosas de estar infectadas debido a sus síntomas como amarillamiento, necrosamiento de las inflorescencias, etc.

El ADN se aisló de las muestras biológicas de plantas utilizando el protocolo de CTAB (20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 2-mercaptoethanol en agua estéril) a 65°C por 1 hora de acuerdo a Harrison *et al* (1994). El ADN se precipitó con etanol, y se centrifugó. La pastilla fue resuspendida en 100 µl de amortiguador TE (1 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8) e incubado con RNAsa por 1 hora a 37°C. Para hacer precisa la comparación se cuantificó el ADN de las palmas infectadas por fluorometría. El ADN obtenido fue cuantificado usando el estuche Fluorescent DNA Quantitation (BIO-RAD, EUA) y las mediciones se realizaron en flurómetro VersaFluor (BIO-RAD) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de 100 ng de ADN por palma.

El método de la invención tiene aplicación en las siguientes especies de palmas: *Adonidia merrillii*; *Aiphanes lindeniana*; *Allagoptera arenaria*; *Arenga engleri*; *Borassus flabellifer*; *Caryota mitis*; *Caryota rumphiana*; *Chelyocarpus chuco*;



Cocos nucifera; *Corypha taliera*; *Crysophila warsecewiczii*; *Cyrtosperma*; *Dictyosperma álbum*; *Dypsis cabadae*; *Dypsis decaryi*; *Gaussia*; *belmoreana*; *Howea forsteriana*; *Hyophorbe verschaffeltii*; *Latania lontaroides*; *Livistona chinensis*; *Livistona rotundifolia*; *Nannorrhops ritchiana*; *Phoenix canariensis*; *Phoenix dactylifera*; *Phoenix reclinata*; *Phoenix rupicola*; *Phoenix sylvestris*; *Pritchardia affinis*; *Pritchardia pacifica*; *Pritchardia remota*; *Pritchardia thurstonii*; *Ravenea hildebrandtii*; *Syagrus schizophylla*; *Trachycarpus fortune*; *Veitchia arecina*. La Tabla 4 muestra los resultados de comparación de sensibilidad de las técnica de PCR anidado y el PCR tiempo real en 10 palmas infectadas.

10

Tabla 4.- Comparación de la sensibilidad de las técnica de PCR anidado y el PCR tiempo real utilizando la sonda y los oligonucleótidos descritos en la presente invención para la detección del 'Ca. *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal.

Método de detección	Dilución de ADN					
	100 ng	10ng (1:10)	1.0 ng (1:100)	0.1 ng (1:1000)	0.01 ng (1:10000)	0.001 ng (1:100000)
PCR tiempo real	100% (10/10)	100% (10/10)	70% (7/10)	30%(3/10)	10%(1/10)	0 %(0/10)
PCR anidado	100% (10/10)	70 % (7/10)	60% (6/10)	20% (2/10)	0 % (0/10)	0% (0/10)

15

El análisis de PCR anidado convencional para detectar al 'Ca *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal se realizó de la siguiente manera: La reacción de PCR anidado consistió en dos rondas de amplificación. La primera ronda se adicionó un par de cebadores universales P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991; Smart et al. 1996). Con los siguientes parámetros: desnaturalización por 60 s a 94 °C; 35 ciclos de alineamiento a 54 °C por 50 s y extensión a 72 °C durante 80 s (10 min para la extensión final). En La segunda ronda de amplificación se realizó una dilución 1:40 en agua destilada estéril del primer producto de amplificación utilizando un par de cebadores específicos para el 'Ca *Phytoplasma*

20

palmae' causante del amarillamiento letal LY503f/LY16Sr
Para la reacción de anidado se utilizaron los siguientes parámetros: denaturaliza-
ción por 30 s a 94 °C; 35 ciclos de alineamiento a 60 °C por 50 s y extensión a
72 °C durante 80 s (10 min para la extensión final). En todos los ensayos de PCR
se incluyeron el control positivo que consistió en ADN de una palma infectada y el
control negativo que es agua estéril. En ambos casos de amplificación se utilizó
1.5 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, E.U), Amortiguador SuperMix (Invitro-
gen), 400 nM de cada cebador, 200 µM de dNTPs y 2.0 mM de MgCl₂. Al final de
la segunda reacción se tomo una alícuota de (10 µl) de las muestras amplificadas
y se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa, el cual tiñó con bromuro de
etidio y se visualizo en un tras iluminador de UV. Los geles fueron fotografiados
con una cámara KODAK utilizando el programa EDAS.

Las reacciones de PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo en un volumen final
de 20 µL que contenía 25 ng de ADN. Se utilizó el amortiguador TaqMan
Universal PCR master mix (Applied Biosystems), 1 µL de la mezcla de los
cebadores (900 nM) 5'-GCTAAAGTCCCCACCATAACGT-3' Secuencia sentido y
5'- CGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGT-3' (900 nM) secuencia antisentido y
sonda 5'-CCCCTGTCGTTAATTG-3' (250 nM). La amplificación y la detección se
obtuvieron al utilizar el termociclador de PCR en tiempo real CFX96 (BIO-RAD,
EUA). Se utilizó el siguiente programa: 2 min a 50°C para activar la AmpErase
UNG (Applied Biosystems) la cual previene la amplificación de de ADN previa-
mente amplificado, 10 min a 95 °C seguido de 35 ciclos 15 s at 95 °C y 60 s a
61°C para la alineación-extensión.

Los resultados mostraron que desde la primera dilución (1:10) la sonda y los
oligonucleótidos descritos en la presente invención pudieron detectar el ADN del
patógeno en el 100% de las muestras, mientras que la técnica de PCR anidado
solo el 70%. En la dilución 1/10000 (0.01 ng ADN) solo se detectó por PCR tiempo
real una muestra, utilizando el análisis de punto final y en el caso del PCR
anidado ninguna muestra dio positiva (tabla 4). Lo que demuestra la mayor



sensibilidad para la detección del 'Ca. *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal utilizando la sonda y oligonucleótidos de la presente invención por medio de PCR en tiempo real que la técnica de PCR anidado convencional.

5 La detección temprana, rápida sensible del 'Ca. *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal es importante para evitar la dispersión rápida de la enfermedad ya que se puede eliminar a la palma infectada, así como para identificar palmas resistentes y tolerantes a la enfermedad lo que puede acelerar un programa de mejoramiento genético.

10

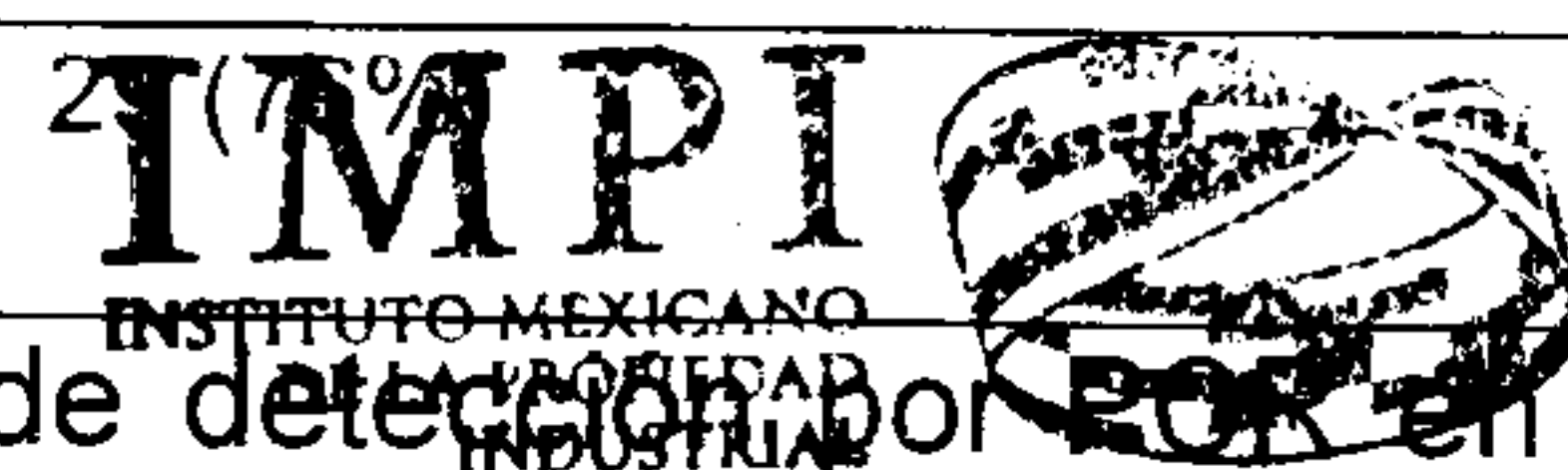
Ejemplo 1. Análisis de palmas con síntomas del amarillamiento letal con PCT tr

15 Para la extracción de ADN de cocotero se utilizó 1 gramo de tejido del tronco. Se utilizó el protocolo de CTAB descrito en la sección Análisis comparativo entre las técnicas de PCR anidado y tiempo real. El ADN obtenido fue cuantificado usando el estuche Fluorescent DNA Quantitation (BIO-RAD, EU) de acuerdo al método descrito en la sección Análisis comparativo entre las técnicas de PCR anidado y tiempo real. En general se utilizaron 25 ng de ADN como molde para las reacciones de PCR. Las técnicas de PCR en tiempo real y PCR anidado se describen en la sección Análisis comparativo entre las técnicas de PCR anidado y tiempo real. Utilizando ambas técnicas se analizaron palmas con síntomas típicos del amarillamiento letal tomando muestras de tronco. Los resultados mostraron que La técnica de PCR en tiempo real empleando los oligonucleótidos y sonda descritos en la presente patente mostraron más del doble de detección del 'Ca. *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal en palmas con síntomas que la técnica de PCR anidado (Tabla 5).

25

Tabla 5.- Detección del 'Ca. *Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal en palmas que presentas síntomas típicos de la enfermedad evaluado por PCR anidado y PCR en tiempo real utilizando los cebadores y sonda descritos en la presente invención.

Número Palmas analizadas	Detección positiva con PCR anidado	Detección positiva con PCR en tiempo real
--------------------------	------------------------------------	---



En la figura 1 se muestra un ejemplo de una grafica de detección por PCR en tiempo real de muestras de palmas de cocotero sospechosas de estar infectadas con el '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal del cocotero.

5 **Ejemplo 2.** Análisis de embriones en palmas con el '*Ca Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal

10 Para la extracción de ADN de cocotero se utilizó el embrión cigótico proveniente de frutos de aproximadamente 12 meses de edad. Las palmas donde provenías estos frutos estaban infectadas con el '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal de acuerdo al análisis de PCR anidado. La extracción del ADN se realizo de acuerdo al método descrito previamente. El ADN fue cuantificado de acuerdo al método descrito previamente. En general se utilizaron 25 ng de ADN como molde para las reacciones de PCR.

15 La detección por PCR en tiempo real y PCR anidado se realizó de acuerdo a los métodos descritos previamente. Se comparó la detección del '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal por ambas técnicas, esta vez en embriones provenientes de las palmas que presentaron la presencia del '*Ca. Phytoplasma palmae*'.
 20 Con PCR anidado solo 20 embriones de un total de 185 fueron positivos, con PCR en tiempo real 59 de 185 fueron positivos utilizando el análisis de punto final (Tabla 6).

Tabla 6.- Detección del '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal en embriones cigóticos provenientes de palmas que mostraron la presencia del '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal por PCR anidado y PCR en tiempo real utilizando los cebadores y sondas descritos en la presente invención

Número total de embriones	Detección positiva con PCR	Detección positiva con PCR en
---------------------------	----------------------------	-------------------------------

analizados	anidado	tiempo real
185	20 (11%)	59 (32%)



La invención se utiliza para identificar las palmas de cocotero que son infectadas por el '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal. Esta habilidad de poder identificar rápidamente a las palmas con el '*Ca. Phytoplasma palmae*' es benéfica para los productores, fitomejoradores o autoridades fitosanitarias en los programas de manejo de enfermedades. El ensayo de PCR en tiempo real de la presente invención puede ser usado para seguir el avance de la enfermedad, o eliminar palmas que presenten al '*Ca. Phytoplasma palmae*' previo a la aparición de síntomas, analizar lotes de plántulas o embriones durante el intercambio de germoplasma entre países. También se podría seleccionar palmas que contengan al '*Ca. Phytoplasma palmae*' causante del amarillamiento letal pero que no presenten síntomas. Esta información puede llevar a mejorar la resistencia a la enfermedad a través de un programa selectivo de mejoramiento genético. En términos del manejo de la enfermedad un diagnóstico temprano del amarillamiento letal AL es extremadamente importante para conservación de plantaciones comerciales porque permitiría eliminar las palmas infectadas y de esta manera disminuir el avance de la enfermedad. Actualmente no hay una prueba de diagnóstico que facilite la detección temprana en un tiempo y un nivel de sensibilidad del ensayo de PCR en tiempo real de la presente invención.

Además, la descripción incluye cualquier combinación o subcombinación de los elementos de diferentes especies y/o modalidades descritas en la presente. Una persona con conocimientos técnicos medios en la materia reconocerá que estas características, y por lo tanto el alcance de esta divulgación, deberá interpretarse a la luz de las siguientes reivindicaciones y cualquier equivalentes de las mismas.

REIVINDICACIONES



1.- Un juego de oligonucleótidos para la detección del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en palmas, caracterizado porque comprende:

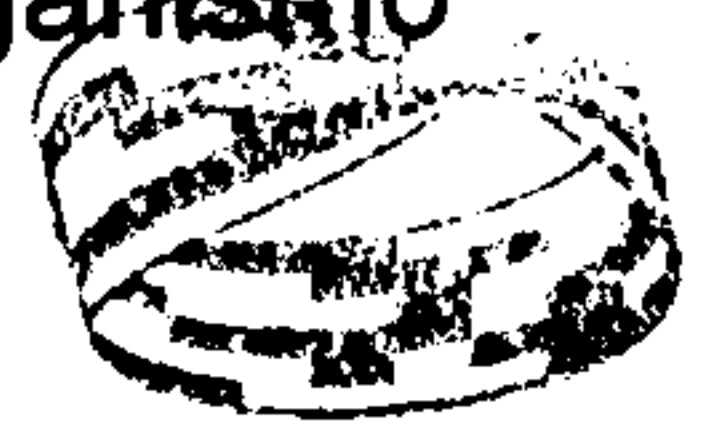
- un oligonucleótido sentido que consiste de la secuencia 5'-GCTAAAGTCCCCACCATAACGT-3' (SEQ ID NO. 1); y
- un oligonucleótido antisentido que consiste de la secuencia 5'CGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGT-3' (SEQ ID NO. 2).

2.- El juego de oligonucleótidos de la reivindicación 1, caracterizado porque dichos oligonucleótidos hibridan específicamente con la región 265-287 y 323-348 respectivamente, en dirección 5'-3' de la secuencia del gen 16S ribosomal del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en palmas (número de accesoión Genbank, AGF498309), o con su complemento.

3.- Una sonda para la detección del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en palmas que consiste de la secuencia 5'-CCCCTGTCGTTAATTG-3' (SEQ ID NO. 3).

4.- La sonda para la detección del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en palmas de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque dicha sonda hibrida específicamente con la región (291-307) en dirección 5'-3' de la secuencia del gen 16S ribosomal del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en palmas (número de accesoión Genback, AGF498309) o con su complemento.

5.- La sonda de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque contiene una molécula reportera fluorescente en uno de sus extremos y una molécula apagadora en el otro extremo.



6.- Un método para la detección en tiempo real del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en palmas comprende las etapas de:

a) obtener una muestra biológica de una palma ~~presuntamente infectada~~ con el microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal;

b) aislar ADN de dicha muestra de la palma presuntamente infectada;

c) amplificar el ADN mediante PCR en tiempo real con un juego de oligonucleótidos y una sonda,

d) detectar la fluorescencia emitida por la sonda durante cada ciclo de amplificación mediante PCR en tiempo real; y

e) determinar la presencia del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en la palma,

caracterizado porque el juego de oligonucleótidos comprende

un oligonucleótido sentido que consiste de la secuencia 5'-GCTAAAGTCCCCACCATAACGT-3' (SEQ ID NO. 1), y

un oligonucleótido antisentido que consiste de la secuencia 5'-CGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGT-3' (SEQ ID NO. 2),

y una sonda que consiste de la secuencia 5'-CCCCTGTCGTTAATTG-3' (SEQ ID NO. 3);

en donde la cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en palmas.

7.- El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la etapa de amplificación mediante PCR se lleva a cabo conforme al perfil térmico que consiste de: (a) 1 ciclo de 2 min a 50°C, para activación; (b) 1 ciclo de 10 min a 95 °C, y (c) 35 ciclos 15 s a 95 °C y 60 s a 61 °C, para la alineación-extensión.

8.- El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde la muestra biológica se selecciona de embriones, semillas, hojas, tallos y/o combinaciones de los mismos.



9.- El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde la sonda contiene una molécula reportera fluorescente en uno de sus extremos y una molécula apagadora en el otro extremo.

5

10.- Un kit para la detección del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en palmas mediante PCR en tiempo real, que comprende:

un oligonucleótido sentido que consiste de la secuencia
10 5'-GCTAAAGTCCCCACCATAACGT-3' (SEQ ID NO. 1);

un oligonucleótido antisentido que consiste de la secuencia
5'-CGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGT-3' (SEQ ID NO. 2); y

una sonda que consiste de la secuencia
5'-CCCCTGTCGTTAATTG-3' (SEQ ID NO. 3).

15

RESUMEN



Se describe un método, oligos y kit para la detección del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en palmas, que comprende las etapas de (a) obtener una muestra biológica de la palma; (b) aislar ADN de dicha muestra de la palma, (c) amplificar mediante PCR en tiempo real con un juego de oligonucleótidos que comprende, un oligonucleótido sentido que consiste de la secuencia 5'-GCTAAAGTCCCCACCATAACGT-3' y un oligonucleótido antisentido que consiste de la secuencia 5'-CGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGT-3', y con una sonda que consiste de la secuencia 5'-CCCCTGTCGTTAATTG-3'; (d) detectar la fluorescencia emitida por la sonda durante cada ciclo de amplificación mediante PCR en tiempo real, y (e) determinar la presencia del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en palmas, en donde la cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN del microorganismo patógeno fitoplasma causante del amarillamiento letal en palmas.

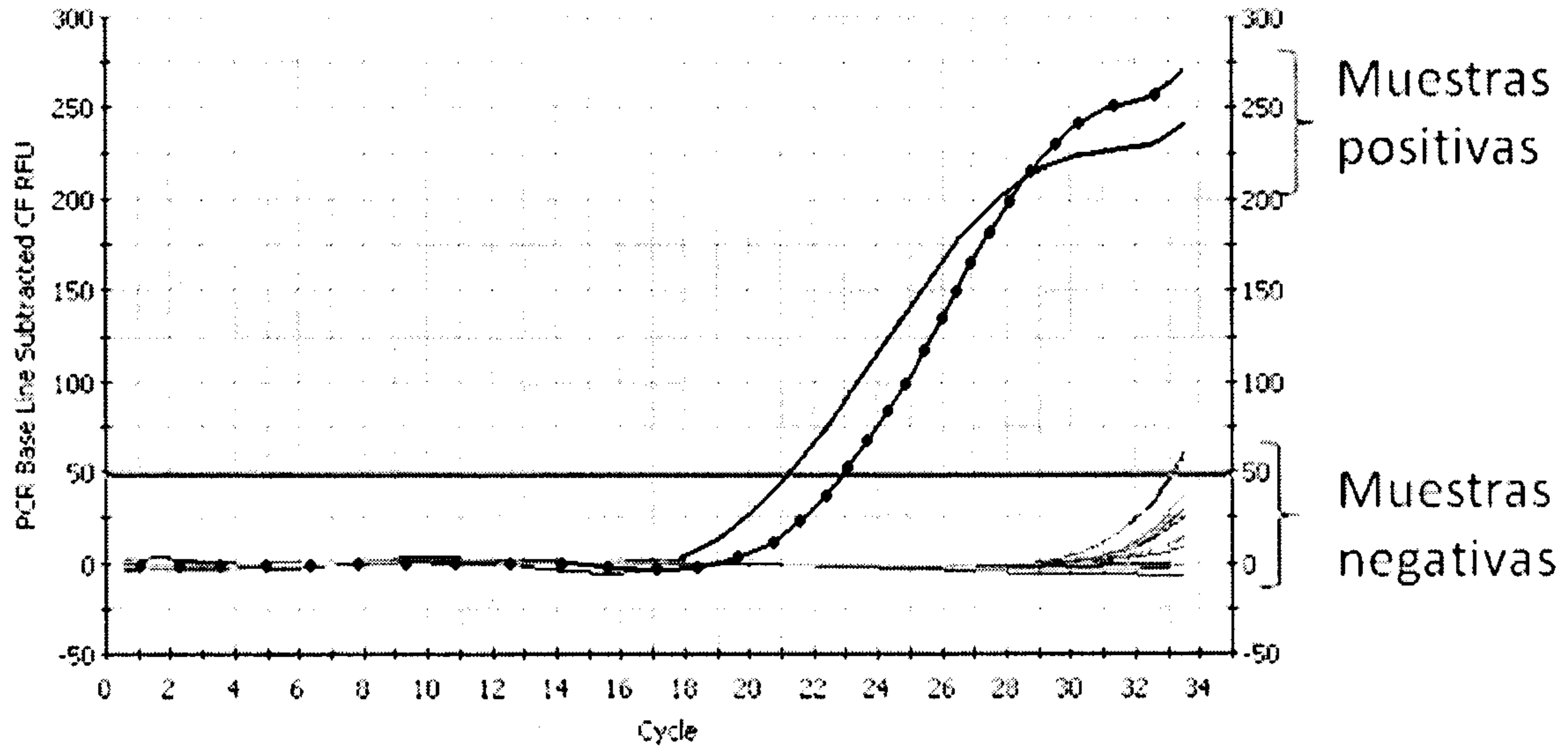


FIG. 1



LISTADO DE SECUENCIAS

<160> NUMERO DE SEQ ID NOS: 3

<210> SEQ ID NO. 1

<211>LONGITUD: 22

<212>TIPO: ADN

<213>ORGANISMO: secuencia artificial

<220>CARACTERISTICA:

<221>NOMBRE/CLAVE: misc_feature

<222>UBICACIÓN: (1)... (22)

<223>OTRA INFORMACION:

<400>SECUENCIA 1:

gctaaagtcc ccaccataac gt

1 10 11 20 21

<210> SEQ ID NO. 2

<211>LONGITUD: 25

<212>TIPO: DNA

<213>ORGANISMO: secuencia artificial

<220>CARACTERISTICA:

<221>NOMBRE/CLAVE: misc_feature

<222>UBICACION: (1)... (25)

<223>OTRA INFORMACION:

<400>SECUENCIA 2:

cgtgtcgtga gatgtaggt taagt

1 10 11 20 21

<210> SEQ ID NO. 3

<211> LONGITUD: 16

<212>TIPO: DNA
<213>ORGANISMO: secuencia artificial
<220>CARACTERISTICA:
<221>NOMBRE/CLAVE: misc_feature
<222>UBICACION: (1)... (16)
<223>OTRA INFORMACION:

<400>SECUENCIA 3:
cccctgtcgt taattg
1 10 11

