



TÍTULO DE PATENTE No. 375156

Titular(es): UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Domicilio: Lascurain de Retana No. 5, Colonia Centro, 36000, Guanajuato, Guanajuato, MÉXICO

Denominación: MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS Y SU USO PARA LA DETECCIÓN DE *Sclerotium cepivorum Berk.*

Clasificación: **CIP:** C12Q1/6844; C12N15/09; C12Q1/6874; C12R1/645
CPC: C12Q1/6844; C12N15/09; C12Q1/6874; C12R1/645; C12N2310/10

Inventor(es): PATRICIA PONCE NOYOLA; ALBERTO FLORES MARTÍNEZ

SOLICITUD

Número:	Fecha de Presentación:	Hora:
MX/a/2014/007055	12 de Junio de 2014	15:39

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 12 de junio de 2034

Fecha de Expedición: 28 de agosto de 2020

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 fracción III, 7º BIS 2 y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo, 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.

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 30 de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:
EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000405397295|Servicio de Administración Tributaria|56||MX/2020/72479|MX/a/2014/007055|Título de patente normal|1220|RRGO|Pág(s) 1|ePQ5+yEG0/LYDdglZ+FEdyKiI8E=

Sello Digital:
F5P3f7TCXoaz7sTOuTy8Mf3JK0uZGGLRAmMRxq6YuwV61CjWiXIMpdq8PiU8W3mUy2aLQRhBIUa+6GeM/UpaZxr4SWwcZc8GrBYulpy4gHGGaq4+RG2VumUorTJww53ilHsGhFsubqi+KTtZWNNXq6vTZYYgiiH59sEsHBNsvnsx2DxqkjGtYXP2fcgE5t8S280k8CtqMG7wVgSuFLC5nbrjxH2sNG87wAj8oemZyXwPfsdv4VltrojJFch4BCfRa7o9QLNbkKsIFwq/5DMA+Os7hgxsx0VdcE7hJpHmvqdpfMugTydSy7JqnArpHOXn7lwlivq9fSADAI7M2t+dwA==



MX/2020/72479



MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS Y SU USO PARA LA DETECCIÓN DE *Sclerotium cepivorum* Berk

5 OBJETIVO DE LA INVENCIÓN

Obtención de siete pares de oligonucleótidos y el método para su uso en la identificación de *Sclerotium cepivorum* Berk.

10 ANTECEDENTES

El hongo *Sclerotium cepivorum* Berk es el agente causal de la pudrición blanca del ajo y la cebolla una de las enfermedades mas perjudiciales que provoca perdidas económicas muy significativas.

15 La pudrición blanca es la principal de las enfermedades fúngicas de las especies del genero *Allium*, al que pertenecen tanto el ajo (*A. sativum*) como la cebolla (*A. cepa*). Cuando el hongo alcanza el bulbo de la planta, después de infectar sus raíces, los síntomas empiezan a ser evidentes, al inicio de la enfermedad aparece micelio blanco y suave, que se extiende alrededor de las raíces, el bulbo y la parte
20 interna de las hojas (Crowe, 1995). Conforme la enfermedad progresa los tejidos enfermos ya no proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento vegetativo del hongo, por lo cual este forma estructuras de resistencia llamadas esclerocios.

25

El grado de daño de la enfermedad está determinado por el número de esclerocios presentes en el suelo, así como por la profundidad

donde se encuentre; a mayor cantidad de esclerocios, más severa será la enfermedad (Crowe et al, 1980).

5 *S. cepivorum* Berk es un hongo deuteromiceto y su rango de hospedero se reduce a plantas del género *Allium* como son el ajo y la cebolla. No es habitante natural de la microbiota del suelo ni endémico de América y es una especie introducida por el tráfico de plantas contaminadas.

10 *S. cepivorum* Berk no se encuentra como saprofito de vida libre sino solamente en forma de esclerocios los cuales son conglomerados hifales con una cubierta de 2 a 4 células de grosor de células melanizada que les confiere resistencia a la desecación y los protege de la degradación microbiana (Huang, 1983). Estas estructuras de resistencia y reproducción son capaces de soportar condiciones
15 adversas como son: luz UV, estrés oxidativo e hídrico así como de resistir la degradación química y biológica (Agrios, 1988; Coley-Smith y Cooke, 1971). Los esclerocios pueden mantenerse en este estado de latencia hasta por 20 años siendo capaces de germinar en presencia de su hospedero al detectar los exudados radiculares
20 liberados por el ajo (Sánchez-Pale y Pérez-Moreno, 1998).

Es importante tener un sistema de marcadores moleculares, con los que se pueda detectar de forma eficiente y rápida el patógeno en muestras de los campos de cultivo o directamente en las hortalizas y
25 con este recurso poder planear la estrategia de manejo del terreno a sembrar. Aplicación de fungicidas, activadores de la germinación del esclerocio etc., de esta manera las pérdidas económicas se minimizarán en gran medida.

Por otro lado, estos marcadores moleculares se podran utilizar para certificar si la semilla de exportación o importación está libre de este hongo patogeno.

5 A nivel mundial se cuenta con un par de métodos para la detección específica de este fitopatógeno.

10 Detección del hongo *S. cepivorum* Berk causante de la pudrición blanca del ajo. Los esclerocios del hongo de la pudrición blanca del ajo pueden ser fácilmente detectables por la inspección visual de los bulbos infectados. En algunos casos, sin embargo, un esclerocio típico y un micelio característico pueden no existir, y la presencia del hongo puede pasar visualmente desapercibido. Por lo tanto, se requieren métodos eficaces y exactos para detectar e identificar el hongo responsable de la pudrición blanca del ajo.

15 El método clásico para la detección del hongo, es la inspección visual al microscopio estereoscópico de los esclerocios después de tamizar las muestras de suelo. Se puede también hacer crecer el hongo de un esclerocio en una placa de agar agua al 1% o PDA. O aislar el hongo en el tejido enfermo, colocar un pequeño trozo de tejido en medio
20 PDA y deje crecer a 18 °C.

25 El método más común de muchos de los kits de diagnóstico de hongos implican el uso del método del cultivo, i.e. Crecer a los hongos en un medio con nutrientes adecuado. El método del cultivo es generalmente utilizado en los laboratorios, tiene distintos inconvenientes. En primer lugar, el método del cultivo es lento, y dependiendo de las especies del hongo, puede tardar semanas para obtener resultados. En segundo lugar, hay que encontrar las condiciones de crecimiento adecuadas para cada una de las cepas, y

aun así algunas cepas del hongo pueden permanecer desapercibidas.

Las estrategias que se han utilizado para resolver los problemas antes mencionados en relación al cultivo del hongo, se han resuelto con los métodos moleculares basados en kits de amplificación e hibridación de ácidos nucleicos. De esta manera la especie de un hongo es detectado e identificado simultáneamente, acelerando el diagnóstico. Por lo que ya no es necesario desperdiciar tiempo en hacer un cultivo del hongo. Generalmente en un método *in vitro* para la amplificación de DNA (PCR), se conocen las secuencias de DNA amplificado especie-específico obtenidas a partir de los iniciadores (oligonucleótidos) específicos para el microorganismo en cuestión, a partir del DNA aislado de una muestra de donde se desea detectar la presencia del hongo.

Se ha reportado el uso de oligonucleótidos para amplificar por PCR el RNA ribosomal 5.8S y parte de la región interespaciadora (ITS) de *S. cepivorum*. Pero esta metodología no identificó aislados de otras regiones, además de que se tiene que secuenciar el fragmento amplificado.

En la patente EP0642588 se describe un método para la detección de hongos patógenos por medio de la amplificación del gen ribosomal 5S y de la región interespaciadora (ITS), esta última requiere secuenciación para su identificación.

La patente US6180339 describe una serie de pruebas para la detección de una gran variedad de hongos patógenos, amplifican genes de RNA ribosomal, es poco específica ya que describe las

pruebas para diferentes variedades de hongos, además requiere de secuenciar los productos amplificados para identificar el hongo.

5 Teniendo en cuenta lo anterior, la invención aquí descrita es nueva y eficaz para detectar específicamente aislados del *Sclerotium cepivorum* Berk que es el hongo responsable de la pudrición blanca del ajo.

BIBLIOGRAFÍA

10 **Agrios, G.N. (1999).** Fitopatología. Segunda Edición. Editorial UTEHA, México D.F. Noriega Editores. Pag: 794-797, 601-603.

Coley-Smith y Cooke, (1971). Survival and germination of fungal sclerotia. Ann. Rev. Phytopathol. 9:65-92

15 **Crowe, F.J. (1995).** White Rot. En: Compendium of Onion and Garlic Diseases. Ed. Schwartz, F.H. and Mohan, S.K. ASP Press. pp 14-16.

20 **Crowe, F.J., Hall, D.A., Greathead, A.S. y Baghott, K.G. (1980).** Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* Berk and the incidence of white rot of onion and garlic. Phytopathology, **70**: 64-69.

Huang, H.C., (1983). Histology, amino acid leakage, and chemical composition of normal and abnormal sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Botany. 61(5):1443-1447.

25

Pérez-Moreno, Salinas, G.J. and Redondo J. E. (1994). Main disease on Allium species in México with emphasis on white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk). Proceedings of Fifth International Workshop on Allium White Roth. Entwistle A. R. and Melero-Vara J. M. (eds.) Cordoba, España. p 6-11

5 **Porteous L.A. and Armstrong J.L.(1993).** A simple mini-method to extract DNA directly from soil for use with polymerase chain reaction amplification Curr Microbiol. 27(2):115-8.

Raeder U, Broda P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters and Applied Microbiology* 1: 17-20.

10 **Sánchez-Pale y Pérez-Moreno (1998).** Viabilidad y colonización a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk causante de la pudrición blanca del ajo y la cebolla en la región el Bajío. *Acta Universitaria. Universidad de Guanajuato* 8: 1-

15 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 Figura 1. Productos de las ampliificaciones separadas por electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio, se muestran los marcadores de tamaño M (DNA del fago lambda cortado con la endonucleasa PstI) y los productos amplificados con los oligonucleotidos P19-08 (carril 1), P14-05 (carril 2) y D7-08 (carril 3).

25 Figura 2. Productos de las ampliificaciones separadas por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio, se muestran los marcadores de tamaño M (DNA del fago lambda cortado con la endonucleasa PstI) y los productos amplificados con los oligonucleotidos 3A11 (carril 1), 13A12 (carril 2), 13A9 (carril 3) y Daqp (carril 4).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El proposito de la presente invención es obtener marcadores moleculares útiles para diagnosticar la presencia de *Sclerotium cepivorum* Berk en muestras de suelo y semilla utilizando técnicas de PCR.

Una técnica que hemos utilizado para tratar de determinar si hay variación genética en los diferentes aislados de un mismo microorganismo es la de RAPD'S (Polimorfismo de fragmentos de DNA amplificados al azar), la cual nos permitió agrupar genéticamente a las diferentes cepas aisladas, sobre la base del patrón de bandas que se amplificaron a partir del DNA de cada cepa, permitiéndonos observar diferencias entre aislados de diferentes regiones del estado de Guanajuato, Aguascalientes y Zacatecas.

Con la finalidad de obtener marcadores más específicos de *Sclerotium cepivorum* Berk, y poderlos utilizar en muestras de suelo y de semilla, se modificaron las condiciones de amplificación que se tenían para RAPD's, aumentando la temperatura de alineación de los iniciadores, lo que nos permitió seleccionar los iniciadores que amplificaran bandas a altas temperaturas de alineación y posteriormente aislamos estos fragmentos, se secuenciaron y en base a esas secuencias, se seleccionaron regiones no codificantes, a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores para tener marcadores específicos del hongo, que sirven para su detección en muestras de suelo y semilla.

Para la obtención de marcadores moleculares específicos de *S. cepivorum* Berk, se analizó el patrón de amplificación del DNA de 24 aislados de *S. cepivorum*, cuya selección fue al azar. La amplificación se efectúa a 50°C generando productos de DNA específicos para *Sclerotium cepivorum* Berk.

Estos marcadores se han utilizado con DNA extraído de muestras de suelo y semillas de ajo para identificar *S. cepivorum* Berk, se utilizó como control el DNA de los siguientes hongos productores de esclerocios: *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, y *Macrophomina phaseolina*.

Se describe la técnica de obtención de DNA total de muestras de suelo, a partir de lo descrito por Porteous y Armstrong (1993), en donde el DNA se separa de los contaminantes del suelo por electroforesis en geles de agarosa y directamente se utiliza el fragmento del gel para realizar la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), la cantidad de muestras que se pueden analizar con esta técnica es cercana a 50 muestras por día.

Hemos diseñado un juego de iniciadores (secuencias de oligonucleótidos) que por medio de la técnica de PCR amplifican dando un patrón específico para *S. cepivorum* Berk. Los cuales se utilizan para la detección del patógeno en muestras de suelo y semilla.

La presente invención proporciona siete pares de oligonucleótidos específicos, oligonucleotidos que son utiles en la determinación, la identificación y la detección de ácidos nucleicos, especialmente DNA,

proveniente del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk por medio de métodos de amplificación de DNA o de RNA por la técnica de PCR.

Nombre del iniciador	tamaño	Secuencia del oligo (5'-3')	Tamaño del amplificado	T de amp
Sc3A11d	20	CGCCCTTAGTCAGCCACCAC	450pb	68°C
Sc3A11r	30	TGTTTTGTTGTTTGTCTGTAGATTCATTC		
Sc13A9d	23	ATTCGCCCTTCAGCACCCACCAC	417pb	68°C
Sc13A9r	24	TTCCAAATCCATCAAAATCCACAT		
Sc13A12d	20	TCGCCCTTCAGCACCCACAC	597pb	68°C
Sc13A12r	30	TCAATCAATCAATCAATCAACACAACATCT		
Daqpd	22	ATTCGCCCTTAGTCAGCCACAG	638pb	68°C
Daqpr	22	CATTCGCAGCGGAGATTCATTA		
D7-08d	20	CTCACTCACTTCACCCTCTC	555pb	68°C
D7-08r	20	CTAGCCTTAGCACACTGGTT		
P14-05d	19	CGGTACCTGTGTCGTGTAG	448pb	68°C
P14-05r	20	CTCCGAACACGGAGAATAC		
P19-08d	18	AGTTGGTGGGGTTCGTAT	788pb	68°C
P19-08r	20	CTGGCTACTGTGAGCTTCT		

Tabla 1

La presente invención describe las secuencias de oligonucleótidos que hibridan específicamente con secuencias del DNA de *S. cepivorum* Berk (Tabla 1). Es decir, una secuencia de ácido nucleico que
5 contiene 18 a 30 unidades de nucleótido e hibrida específicamente con el DNA del hongo *S. cepivorum* Berk, amplificando por PCR una secuencia de ácido nucleico seleccionada e identificada por secuenciación.

10 La Tabla 1 muestra las secuencias de los oligonucleótidos en cuestión y sus características.

Estas secuencias son útiles en diferentes métodos de amplificación del ácido nucleico utilizándolas como iniciadores en la técnica de PCR o como sondas en la técnica de Southern.

15 La invención puede ser explicada por medio de los siguientes ejemplos, sin limitarse a éstos:

EJEMPLO 1

Detección molecular de *Sclerotium cepivorum* Berk con tres pares de oligonucleotidos específicos

20 Se aisló DNA del micelio de la cepa Sc2 de *Sclerotium cepivorum* Berk, por medio del método descrito por Raeder y Broda (1985).

En las condiciones optimizadas para PCR, los pares de iniciadores u oligonucleótidos: P19-08, P14-05 y D7-08, amplificaron un fragmento único de 788pb, 448pb y 555pb respectivamente (figura 1).

EJEMPLO 2

Detección molecular de *Sclerotium cepivorum* Berk con cuatro pares de oligonucleotidos específicos

5 Se aisló DNA del micelio de la cepa Sc2 de *Sclerotium cepivorum* Berk, por medio del método descrito por Raeder y Broda (1985).

En las condiciones optimizadas para PCR, los pares de iniciadores u oligonucleótidos: 3A11, 13A12, 13A9 y Daqp, amplificaron un fragmento único de 450pb, 597pb, 417pb y 638pb respectivamente (figura 2)

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito lo suficientemente mi invención declaro de mi exclusiva propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

5 1. El Método para la detección de *Sclerotium cepivorum* Berk que consiste en un conjunto de oligonucleótidos para la detección del hongo, que comprende 7 pares de oligonucleótidos y consiste en:

10 a) A partir de una muestra de DNA del hongo, ajo contaminado con el hongo o muestras de suelo, extraído por cualquier método.

b) Amplificación del DNA de la muestra a la que se refiere el inciso (a) por medio del método PCR amplificando a 68°C y utilizando los siete pares de los oligonucleótidos que se describen a continuación:
Par 1

15 Derecho (Sc3A11d) CGCCCTTAGTCAGCCACCAC

Reverso (Sc3A11r) TGTTTTGTTGTTTGTCTGTAGATTCATTC

Par 2

Derecho (Sc13A9d) ATTCGCCCTTCAGCACCCACCAC

Reverso (Sc13A9r) TTCCAAATCCATCAAAATCCACAT

20 Par 3

Derecho (Sc13A12d) TCGCCCTTCAGCACCCACAC

Reverso (Sc13A12r) TCAATCAATCAATCAACACAACATCT

Par 4

Derecho (Daqpd) ATTCGCCCTTAGTCAGCCACAG

25 Reverso (Daqpr) CATTCGCAGCGGAGATTCATTA

Par 5

Derecho (D7-08d) CTCACTCACTTCACCCTCTC

Reverso (D7-08r) CTAGCCTTAGCACACTGGTT

Par 6

30 Derecho (P14-05d) CGGTACCTGTGTCGTGTAG

Reverso (P14-05r) CTTCCGAACACGGAGAATAC

Par 7

Derecho (P19-08d) AGTTGGTGGGGTTCGTAT

Reverso (P19-08r) CTTGGCTACTGTGAGCTTCT

5 En donde la amplificación de cada una de las 7 bandas de tamaño específico es indicativa de la presencia de *S. cepivorum*.

RESUMEN

La presente invención se refiere a un conjunto de iniciadores, para identificar o predecir la presencia de *Sclerotium cepivorum* Berk agente causal de la pudrición blanca del ajo y cebolla, en muestras de suelo y semilla de ajo, por medio de marcadores moleculares.

La presente invención se refiere a materiales en el campo de la biología molecular. En particular, a secuencias de nucleótidos aislados recientemente, a secuencias de nucleótidos que tienen una identidad substancial con la misma y a los equivalentes de la misma.

La invención involucra identificar un patrón de amplificación de fragmentos de DNA o firma molecular, que indica la presencia del hongo. Se han identificado los patrones moleculares, que comprenden siete grupos/series de marcadores moleculares, los cuales tienen relevancia en la determinación de la presencia del hongo.

Se aplica tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a DNA extraído de material vegetal o suelo

1/2



Figura 1

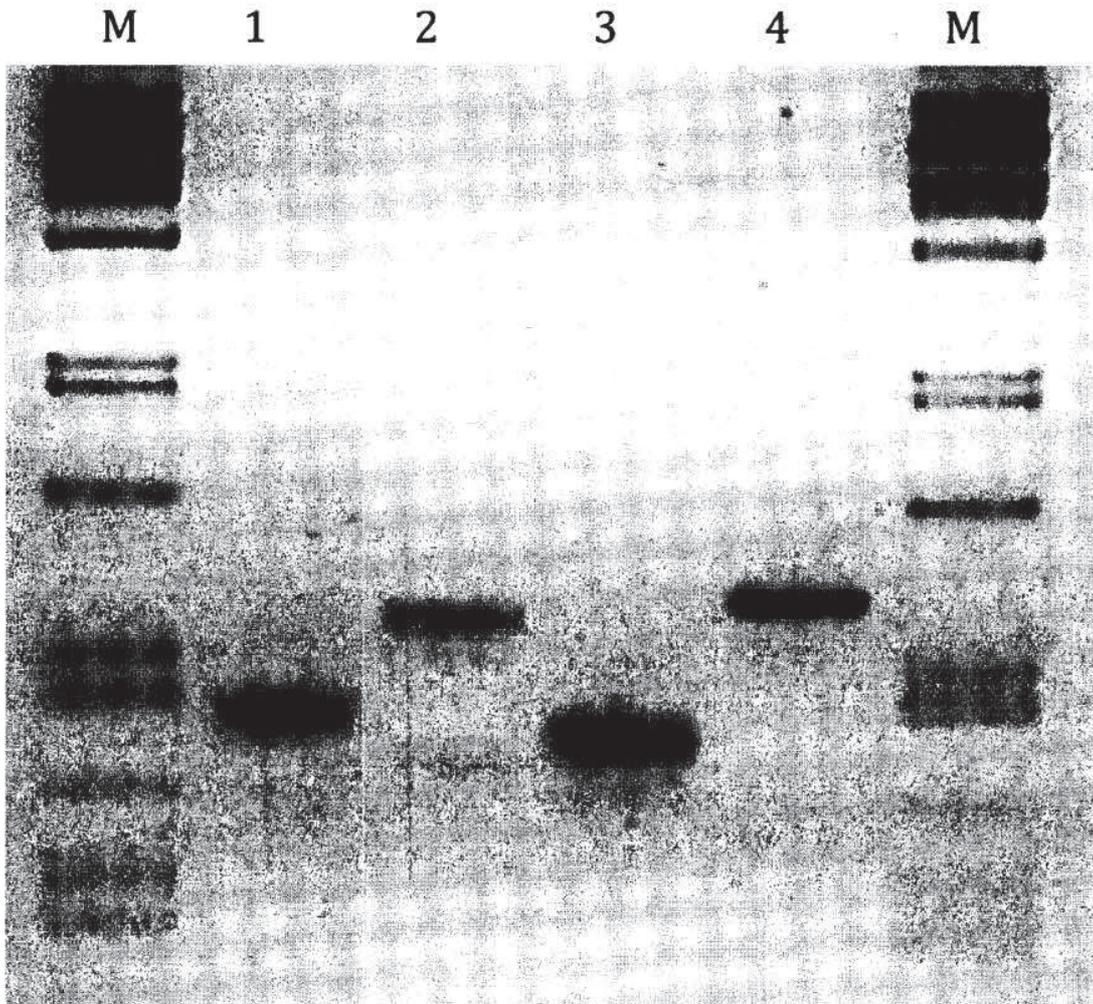


Figura 2

1/7

Listado de secuencias

<110> Universidad de Guanajuato

<120> Marcadores moleculares específicos y su uso para la detección de
Sclerotium cepivorum Berck

<140> MX/a/2014/007055

<141> 2019-05-22

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1 Secuencia Sc3A11

<211> 451 pb

<212> DNA

<213> Sclerotium cepivorum

<400> 1

cgcccttagt cagccaccac caaaccttca tgccttctc aagcaaggaa atctaaaac	60
agacaagcaa caaaagtgtc tgcctatcaa aatttaaaga atactcttat ctaaaacaag	120
gaagaagata tatagatgag caacaaaaaa cctcctttat tcccgaggtc cttcaatag	180
attctaaaac aagggtttc agatcagaca agcaacaaag tatctggtct tatacaatte	240
atgaaacctg gactttaaaa agcaaggaaa taaatttata gacaagcaac aaaaaactct	300

2/7

tcgattcttc aatatataatt catggaattia taacctcaag aaaagaaaca agaaattcca 360

ttgagaaaca aatctctttc aatatgact acctaatct tcttcacatc aaaaaccaag 420

gaaatgaatc tacagacaaa caacaaaaca t 451

<210> 2 Secuencia Sc13A9

<211> 417 pb

<212> DNA

<213> Sclerotium cepivorum

<400> 2

attcgccctt cagcaccac cacggacacg gccgcaatga agtagacgtt accgatcatc 60

atttngtatg ctggataagg caactaaacc tttcttatg ctgacaggat gtaggtgttg 120

tacacagtaa aatagaagtc gacctcttt caaggcagga cgagaattga ttggaaagaa 180

aggacttgag agagattctt cgtggtgac gacacaaagt cttatataga gaaaaggatt 240

gaagcgtgg ggtaataatg gacacagaga agggttggaa taatggaatc tggagatgta 300

gcaagtggag taggaagaag ggccgaacct tacctatgga tctctcaag cttttacctt 360

taactgtcaa tcatcacggg gattgtcctt gccatgtgga tttgatgga ttggaa 417

<210> 3 Secuencia Sc13A12

<211> 597 pb

3/7

<212> DNA

<213> Sclerotium cepivorum

<400> 3

tcgccctca gcacccacac ccaagagaaa tcgatggact ctcatgggaa aaaacaacgc 60

ttcacctatt tccgttfaat acttggcatg aatgaatett cggaaggaaa ctgaacaga 120

aaatcaatat tgctcaatct caatatatta atccaaaagc gaagggaaac ttgcagatct 180

tcagagagtg aatcgtatcg cttcttgtat tgaagggtc attfactctt agaaatgacg 240

cttgaacga tcgatgggtc tcccggaatc cttttcgcg cctcgcacgc tagggttaca 300

atatactgt atgttgtgc ctacgttgt tigtffacat acctatgtct ttattggatt 360

catggccctt tttagctatt tgtctgttc gactgacgc agctgaactg agagatatcg 420

atatatttta ctaataaatt acctacttca tttcattcg tgggaatatt taatgtaatt 480

ttctttttt gtaggaatac attcattcat tcattcgttc gctgagaaat agctgcaaag 540

aaagagggga tggtttctaa atttggtaga tgttgtgttg attgattgat tgattga 597

<210> 4 Secuencia Sc3A2.0

<211> 638 pb

<212> DNA

<213> Sclerotium cepivorum

4/7

<400> 4

atfcgccctt agtcagccac aggaggcga tgtgctctc ttctagttc gacatcatt	60
actgacaatt atcattctta tattcagaat gtctttgata tcgagaattc ctacgaaga	120
actccggtgc aaccacttgg tttagcattc tacaactaca accaaaggcc cagtcaagaa	180
tttaaccctc catttcatt gtfcxaaact caagctatcg taaccggcaa gtgagggcaa	240
cctccgtaa aatttcaaaa tctttaata ccgaccaaat accgaccaat actaccatct	300
caatcacaat gggctcaag tctatggcaa atcaaaagaa cgcagttaga agtggatctc	360
tccattcagt caacaagaa ccatgaaccg ttgcaaaacg ccttgcgacc tagtaacaca	420
catgccaact caaccctcac tctatcgcca ttaacaagat ctcccgcat atccgtccat	480
gaagcgtttt aattgccacg tgattcgttg ccttaaccg cccgtgagta ctaatcacct	540
acttcatgaa tggatgigaa acgtagatgg tgatggttct gctccgatcc attttgaa	600
tggtttcgca ctggattaat gaatctccgc tgcgaatg	638

<210> 5 secuencia D7-08

<211> 555 pb

<212> DNA

<213> Sclerotium cepivorum

<400> 5

5/7

ctcactcact tcaccctctc gcttacaagg cctacacaaa atttgctaga tacagctaat	60
ttcacttatt actactagtc caccacccac acaaattgc aaatatgcag gtccgaaggt	120
tagcgcgtaa ggctgtattt catgattatt catcatttat ttcgcacccc ttgccaata	180
tccgatatcc aacatcacat tgaagtctac ggagtacttc atcatctact gtatgtagta	240
aagtagtaaa gtttaaalgt gatggtggtt cggagaagaa atttcatact ttcttaaaa	300
caaagtttgg ggatcgtatt accccgacgg tccatagaac aagactacag agttagacat	360
ttggaaalca tgitgacagg tgggtcggaa attaattttt ttatcttccc caatcgaaga	420
aatgtcaatt catggcatta ttcttatttg gatcatcaaa gtcatgcccc ttctctteta	480
cgtttttate cggtaatttt ataacgaaag caaagaagct gttggtaag ttgctaacca	540
gtgtgctaag gctag	555

<210> 6 secuencia P14-05

<211> 448 pb

<212> DNA

<213> Sclerotium cepivorum

<400> 6

cggtaacctgt gtcgtgtaga atagtctgtg aatgtctgct ttcgttctgg gaattgtgtt	60
gcgtataacg aatgaaattg gtcctcactt cggggaatct aagatgtatt atattattag	120

6/7

aaatgagttt gacagtgtaa tctatggaat tctccaggaa aagagggaga attgaaatct 180

actaatgacg tattgttagt tagcttcatg tcagtgaggt tgagcagtga ctgggggcgg 240

ccaagtcttc ttgtattaa aaccagtatt tgaggactat tgatggctca tgctgataac 300

tatagactat taattgctg gttttccat acaacattca aaggtttgag tgatcactga 360

tgctggagta gattggaatg gctactccaa aaatcaatct attacgggaa ccaagtcgcg 420

tcaaaatggt attctccgtg ttcggaag 448

<210> 7 secuencia P1908

<211> 788 pb

<212> DNA

<213> Sclerotium cepivorum

<400> 7

agttggggg gttcgtattt cectgaaatc atgattcatg catgatagag aaacttttt 60

gatatctcgt atcggtatcg gcatcggcac cggcacaac tgaatgaagc tagaaggcgg 120

gagctccgaa agcttcaagt caattggtaa atagegctga agacttatca ccaatgatat 180

gtgaagttta aacattaaac tccatacaat tccagcactc catccgatc ttctgcggat 240

ctggcgaaca gcaactgaatt gaagettaaa attcccgtac acgagattct tggcaggagc 300

7/7

taggaaacag gactcagtgt tgagaagttt aatacagaggc gcaggaatca gtaatcacac	360
tctgccgtac agccacgatt ttcaagagtg atgttgctat gtactacaac taactctacc	420
actaccattc attagtgaca attgatcact ctattggat gctatactga ttctgaatc	480
ataaatgta aatgaattga tttgaattc aattgagta ttccggata agagtatggt	540
gcgttggcgc gggatatata tcttcaatcc atagtagcgc ccaatggatt gtccttcccc	600
ccaccacaa cccactcaaa gggccccggc tcatggacag caaccacggc aaactatcta	660
tatttatcaa atgatagaaa ttcgaataat agattgaaga gaattctaaa acataacttt	720
ttattatc gaaaatata agtaattgaa tctacacacg aaccacaaag aagctcacag	780
tagccaag	788