

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

Diversidad y filogenia de *Burkholderia* sp. aisladas en diferentes regiones del estado de Puebla

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGIA)

Con opción en Bioquímica y Genética Microbiana

PRESENTA

Q.F.B. Israel Cervantes Álvarez

DIRECTOR DE TESIS

D.C. Vianey Marín Cevada

Heroica Puebla de Zaragoza, noviembre de 2016



BUAP

Puebla, Pue. a 14 de octubre 2016.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Israel Cervantes Álvarez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Diversidad y filogenia de Burkholderia sp. Aisladas en diferentes regiones del estado de Puebla”

A nuestro juicio, el alumno **Israel Cervantes Álvarez** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente,
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez



M.C. Silvia del Carmen García García

D.C. Jesús Muñoz Rojas

D.C. Antonino Baez Rogelio

Aequat omnes cinis: Impares nascimur, pares morimur.
A todos nos iguala la ceniza: desiguales nacemos e iguales morimos.
(Séneca)

DEDICATORIA.

Este trabajo de tesis está dedicado con todo mi cariño y amor a las personas que son ejemplo de virtudes y son lo más importante para mí:

Mi madre: Margarita Alvarez Gonzáles, su ejemplo de fuerza y lucha constante, sumado a su gran inteligencia y apoyo incondicional ante cualquier circunstancia.

Mi padre: Miguel Fernando Cervantes y Vargas, que con su apoyo y amor incondicional me ha impulsado siempre a seguir adelante, en las buenas y en las malas.

Mi hermana: Andrea Margarita Cervantes Alvarez que admiro demasiado por su dedicación, entrega, inteligencia, su amistad y comprensión hacia mí.

Mi hermano: Fernando Cervantes Alvarez que ha sido ejemplo en muchos sentidos de mi vida y una persona que ha sabido abrir su corazón.

Mi novia: Liliana Chena González que es un gran apoyo e impulso para seguir adelante con mis metas personales, por su comprensión y amor.

A mis amigos de hace muchos años y a los que he empezado a conocer hace poco tiempo que siempre están para animarme a seguir adelante con mis sueños e inquietudes: Diego, Berenice, Ricardo, Fabián, Francisco, Carolina.

A la vida por permitirme experimentar, jugar, aprender, entender, enseñarme como ser mejor persona y darme tiempo de satisfacer lo deseado.

AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla mi *Alma mater*, por brindarme una vez más una oportunidad de desarrollo intelectual, personal y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para llevar a cabo los estudios de Maestría.

A la Doctora Vianey Marín Cevada por su entrega, paciencia y dejarme ser parte de su equipo de trabajo.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (VIEP-BUAP) por el apoyo brindado para la impresión y encuadernación de tesis.

Al cuerpo académico del Instituto en Ciencias Microbiológicas por compartir sus conocimientos.

Tabla de contenido

Resumen.	- 1 -
I. Introducción.	- 3 -
A. Diversidad y filogenia bacteriana.....	- 3 -
B. Generalidades del género <i>Burkholderia</i>	- 6 -
II. Antecedentes.....	- 6 -
III. Planteamiento del problema.....	- 17 -
IV. Justificación.	- 17 -
V. Objetivos.....	- 18 -
A. General.	- 18 -
B. Objetivos particulares.....	- 18 -
VI. Material y métodos.....	- 18 -
A. Reactivación de cepas.	- 18 -
B. Identificación Molecular.....	- 25 -
1. Amplificación del gen ribosomal 16S utilizando oligonucleótidos semi-específicos.	- 25 -
2. Amplificación BOX-PCR.....	- 26 -
3. Detección de cepas con oligonucleótidos GB-F GBN-2R, cepas patógenas para plantas o pertenecientes al complejo cepacia por medio de la técnica de PCR.....	- 27 -
C. Amplificación del gen ribosomal 16S.....	- 30 -
D. Purificación de los Productos de PCR.....	- 30 -
E. Secuenciación de productos purificados.	- 31 -
F. Análisis de fragmentos secuenciados.....	- 31 -

G.	Construcción de árbol filogenético con base al gen ribosomal 16S.	- 31 -
H.	Diversidad genética con base a diversidad nucleotídica...	- 32 -
VII. Resultados y discusión.....		- 32 -
A.	Selección de cepas con potencial a pertenecer al género <i>Burkholderia</i> con el uso de los oligonucleótidos Bf y Br.	- 32 -
B.	BOX-PCR.....	- 33 -
C.	Detección de especies pertenecientes al BBC	- 34 -
D.	Detección de <i>Burkholderia</i> spp. utilizando los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R.	- 38 -
E.	Detección de especies patógenas de plantas <i>B. gladioli</i> , <i>B. plantarii</i> y <i>B. glumae</i>	- 43 -
F.	BOX-PCR de mismas fuentes de aislamiento y diferentes situaciones geográficas.....	- 46 -
G.	Diversidad genética calculada con base a la diversidad nucleotídica (π).....	- 63 -
VIII. Conclusiones		- 65 -
IX. Perspectivas		- 65 -
Bibliografía.....		- 66 -
ANEXO I (SECUENCIAS).....		- 78 -
Anexo II (Medio LB adicionado con ácido succínico)		- 90 -
Anexo III (Super Buffer 50X)(Zhang y col., 2011).....		- 91 -

Resumen.

Burkholderia es un género extremadamente diverso y versátil, Gram-negativo y de forma bacilar. Se han descrito actualmente un gran número de especies que se incorporan a éste género llegando a ser 101 especies ya reportadas. Se reconoce la diversidad en torno a la patogenicidad de algunas especies en humanos, animales y plantas, pero destaca también el uso potencial de algunas especies por sus bondades en la promoción del crecimiento de plantas, la fitorremediación, la degradación de agentes xenobióticos, y el biocontrol de agentes patógenos de plantas. Este trabajo trata de la búsqueda de especies pertenecientes al género *Burkholderia* basándose en la diversidad climática en el Estado de Puebla en donde se tomaron en cuenta los climas cálido subhúmedo, templado subhúmedo, seco-semiseco, templado húmedo y cálido húmedo. Es importante la observación de la escases de estudios en torno a este género en México, los estudios se han limitado a estados como Chiapas, Veracruz, Morelos, Tamaulipas, en el Estado de Puebla no hay reportes acerca de *Burkholderia* spp. Este estudio es parte de dos trabajos anteriormente realizados que conforman una colección de muestras de un total de 96 cepas con alta probabilidad de ser *Burkholderia* spp. Se hace además una búsqueda previa que nos ayuda a rastrear especies con probable potencial de fijar nitrógeno, especies que pertenezcan a el denominado grupo “Burkholderias del complejo cepacia” y un tercer grupo enfocado a tres especies patógenas de plantas: *B. gladioli*, *B. plantarii* y *B. glumae*. Esta búsqueda fue realizada con un grupo o “set” de oligonucleótidos que van dirigidos hacia diferentes genes de mantenimiento y ya han sido reportados previamente en la literatura. Es importante conocer el papel que puede tener este género en el ámbito agrícola, el área de la salud y el área ecología-ambiental. Se muestran resultados de la secuenciación y el análisis filogenético del gen ribosomal 16S de las cepas obtenidas de diversas fuentes de interés agrícola, algunas plantas silvestres además de un par de cuerpos de agua, esto esperando entender un poco mas las interacciones que puedan tener estas bacterias con diferentes hospederos, conformando finalmente un total de 47 cepas confirmadas como *Burkholderia* spp. de 96 aislamientos iniciales con potencial de pertenecer a este género.

Se evaluó la diversidad genética con base en la prueba de diversidad nucleotídica y el gen codificante para la subunidad 16S ribosomal para las 47 cepas confirmadas como

Burkholderia spp. mostrando los valores de diversidad entre los tres grupos, además de los valores comparados entre los distintos grupos y finalmente los valores de diversidad nucleotídica por grupo único.

I. Introducción.

A. Diversidad y filogenia bacteriana

La existencia abundante de especies en un ecosistema es definido como biodiversidad y se ha vuelto tema de interés a nivel mundial. La variabilidad biológica entre poblaciones y comunidades de organismos y microorganismos es resultado de la presión de selección impuesta por las condiciones físicas y biológicas del medio ambiente, esto acoplado con las mutaciones o recombinaciones en el genoma de los organismos. La biodiversidad de poblaciones o comunidades contempla la historia adaptativa de los organismos. Todo esto refleja fenómenos complejos que crean la diversidad a través de mutaciones espontaneas, duplicación o pérdida de genes, transferencia horizontal de información genética y la selección propia del medio ambiente (Normand y col., 2015).

La diversidad microbiana en un sentido amplio, es la variedad de microorganismos que hay en la naturaleza y sus adaptaciones. Se consideran como microorganismos los grupos de hongos microscópicos, protistas, archeas, bacterias y virus. A lo largo de su evolución las bacterias han desarrollado una gama de metabolismos, los cuales surgieron como adaptación a los diferentes ambientes terrestres y mediante los que lograron aprovechar diferentes fuentes de energía. A tal punto pudieron adaptarse las bacterias que en su conjunto controlan los ciclos básicos de la materia como son los del carbono, el nitrógeno, el oxígeno y el fósforo (Capello y col., 2000).

El análisis comparativo de genes ribosomales o la filogenia ribosomal, es ampliamente utilizada para inferir las relaciones evolutivas entre especies, especialmente en procariotas. Bajo el principio en el que la filogenia ribosomal es útil como reloj molecular, idealmente adecuado para la reconstrucción de la historia evolutiva. La elección de los genes ribosomales como reloj molecular está fuertemente influenciada por el hecho que, los productos finales son rRNAs, la presión de selección se dirige contra las secuencias primarias de estos genes antes que los genes que codifican para proteínas. Se tienen ventajas adicionales al usar genes ribosomales como marcadores filogenéticos, son de distribución universal, las secuencias son altamente conservadas, son fáciles de secuenciar, y tienen características específicas en sus estructuras primarias y

secundarias debido a porciones con diferente variabilidad a lo largo de las secuencias. (Woese, 1987; Woese, 1998).

Dentro del dominio *Bacteria* y con la secuenciación únicamente del gen ribosomal 16S de especies ambientales se conocen alrededor de 80 grandes linajes (phyla), sin embargo solamente poco más de la mitad de estas especies han podido ser cultivadas y caracterizadas en un laboratorio. Notablemente, más del 90 % de los géneros y especies caracterizadas originan sólo cuatro phyla: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Figura 1).

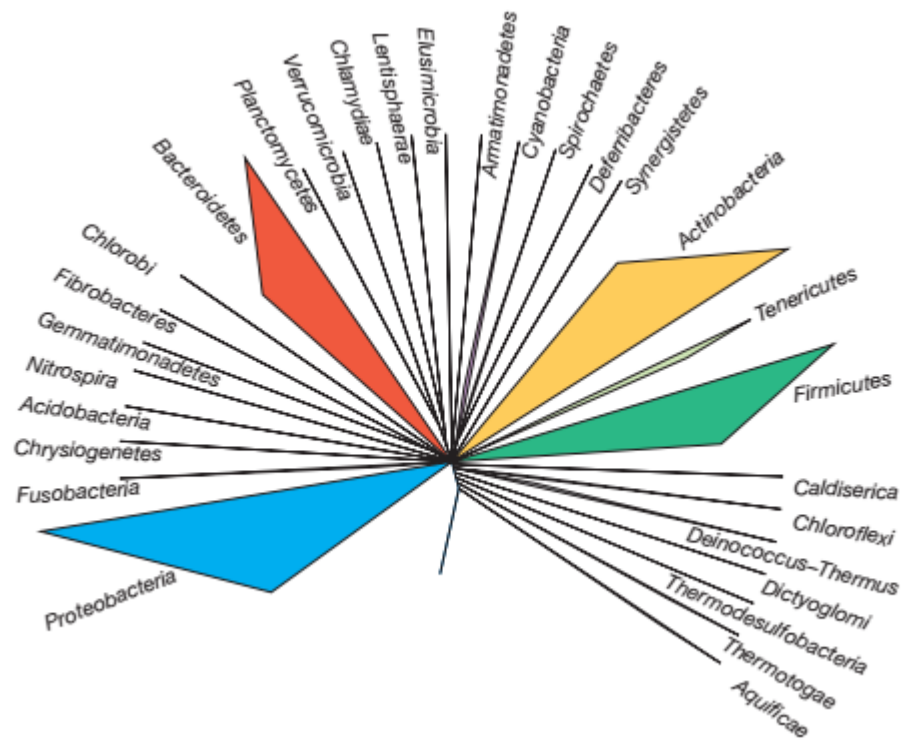


Figura 1. . Madigan y col. (2015) Algunos de los más importantes phyla del dominio *Bacteria* basados en el gen ribosomal 16S. [Figura] Recuperado de Brock biology of microorganisms. Se muestran los phyla más importantes que contienen especies cultivables

El phylum *Proteobacteria*, es por mucho el más grande y más diverso filogenéticamente del dominio *Bacteria*. Más de un tercio de las especies caracterizadas pertenecen a esta agrupación, además se encuentran incluidas dentro de las proteobacterias la mayoría de las bacterias de interés médico, industrial y agrícola.

Como grupo, el phylum *Proteobacteria* en su totalidad son bacterias Gram-negativas. Muestran una amplitud en diversidad en mecanismos de generación de energía, existen especies quimiolitótrofas, quimioorganótrofas y fotótrofas.

Las Proteobacterias están divididas en 6 clases, con varios géneros en cada una de las clases, éstas han sido designadas con una letra griega *alfa* α , *beta* β , *delta* δ , *épsilon* ϵ , *gamma* γ , *zeta* ζ .

La clase de interés en este proyecto es la clase *Betaproteobacteria* y es la tercera más grande de las proteobacterias. Contiene cerca de 500 especies descritas, además de ser funcionalmente muy diversa. En total son seis los órdenes con especies descritas en la clase *Betaproteobacteria*; *Burkholderiales*, *Hydrogenophilales*, *Methylophilales*, *Neisseriales*, *Nitrosomonadales* y *Rhodocyclales* (Madigan y col., 2015).

La diversidad microbiana de suelos está compuesta por la diversidad de especies y la diversidad genética, así como la biodiversidad del ecosistema (Solbrig, 1991). La diversidad de especies consiste en la riqueza de especies, el total de especies presentes, la homogeneidad de las especies y la distribución de ellas (Øvreås, 2000). Sin embargo la definición tradicional de especie se aplica para plantas y animales y no es fácilmente aplicable a procariontes. (Godfray & Lawton, 2001). La diversidad microbiana ha sido usualmente considerada como el número de individuos agrupados en diferentes taxones y su distribución dentro de los taxones. Una de las formas de definir la diversidad microbiana es por medio de la caracterización de su diversidad genética.

La diversidad nucleotídica es uno de los índices más utilizados para estimar la diversidad genética de una población cuando las secuencias de ADN de una población se encuentran disponibles. Debido a que es una función de la variabilidad genética en una población, cuando un individuo con una secuencia de ADN diferente aparece dentro de esta población, el índice de diversidad genética debe incrementar y no debe disminuir (Shimantani, 1999). Para obtener esta información, se consideran el número de diferencias de nucleótidos entre dos secuencias cualquiera simplemente determinando si hay o no diferencias. Esto realizado con el valor de π , el cual cuantifica la principal divergencia entre secuencias y es denominado como diversidad nucleotídica y se calcula de la siguiente manera

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij}$$

Donde x_i y x_j representan las frecuencias de las secuencias i ésimas y j ésimas en la población y π_{ij} es el número de diferencias nucleotídicas por sitio entre las secuencias i ésimas y j ésimas, es decir que calcula la probabilidad que dos secuencias elegidas al azar sean idénticas (Nei, 1987).

B. Generalidades del género *Burkholderia*.

El género *Burkholderia* está integrado por un gran número de especies, actualmente incluye 101 especies de *Burkholderia* (LPSN, 2016). Los miembros de este género son organismos versátiles ocupan sorprendentemente un gran rango de nichos ecológicos (Coenye & Vandamme, 2003).

Se describe como un bacilo recto Gram negativo, catalasa positivo y oxidasa positivo. De movilidad variable, con uno y mas comunmente varios flagelos polares (Brenner y col., 2005).

Éste género pertenece al orden *Burkholderiales*, el cual a su vez pertenece a la familia *Burkholderiaceae*. El orden *Burkholderiales* está comprendido por las siguientes familias: *Burkholderiaceae*, *Oxalabacteraceae*, *Alcaligenaceae* y *Comamonadaceae*.

La familia *Burkholderiaceae* está formada por los géneros *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Lautropia*, *Limnobacter*, *Pandoraea*, *Paucimonas*, *Polynucleobacter* y *Thiomatrix*. Esta familia se caracteriza por mostrar diversidad en sus características fenotípicas, metabólicas y ecológicas. Así, se pueden encontrar bacterias quimioheterótrofas, aerobios estrictos, aerobios facultativos, quimiolitotrofos obligados y facultativos (Garrity y col., 2005).

II. Antecedentes.

La primera descripción del género *Burkholderia* fue en la década de 1950 con la especie *Pseudomonas cepacia* nombrada por Walter Burkholder (Palleroni & Holmes, 1981).

Inicialmente las especies pertenecientes a *Burkholderia* estuvieron clasificadas en el género *Pseudomonas*, consideradas como bacterias no fluorescentes (Kerstens y col., 1996). Migula, quien fue el primero en identificar el género *Pseudomonas* en 1894, lo describió como un bacilo Gram-negativo, con un flagelo polar y estrictamente anaerobio. De igual modo, un gran número de especies de *Pseudomonas* fueron caracterizadas principalmente por medio de pruebas bioquímicas (Stanier y col., 1966). Posteriormente el género *Pseudomonas* fue dividido en cinco grupos (I al V) basados en ensayos de hibridación DNA-DNA (Palleroni y col., 1972) y rRNA-DNA (Palleroni y col., 1973). Fue hasta 1992 que Yabuuchi y colaboradores transfirieron a *P. cepacia* y otras especies a un nuevo género denominado *Burkholderia*, de acuerdo a estudios moleculares, tales como: secuenciación de ARN ribosomal, hibridación DNA-DNA, composición de lípidos celulares y ácidos grasos (Yabuuchi, y col., 1992).

Los resultados obtenidos confirmaron la localización de éstos en diferentes grupos filogenéticos (subclases de *Proteobacteria*) (Kerstens y col., 1996). Finalmente, el género *Burkholderia* quedó clasificado en la subclase β -*Proteobacteria*, en el cual existen géneros tales como *Neisseria*, *Ralstonia* y *Cupriavidus*, distinguiéndose por ser aerobias facultativas.

Eventualmente múltiples especies fueron descritas e insertadas en el género *Burkholderia*, otras fueron removidas o reclasificadas como *Ralstonia pickettii* (antes *Burkholderia pickettii*) y *Ralstonia solanacearum*, (antes *B. solanacearum*) (Yabuuchi y col., 1995; Gillis y col., 1995).

Es sobresaliente que el género *Burkholderia* es taxonómicamente complejo con nuevas especies siendo descritas recientemente de manera vertiginosa. Por ejemplo, las especies estrechamente relacionadas como las pertenecientes al complejo *B. cepacia* son difíciles de identificar utilizando pruebas bioquímicas y fenotípicas convencionales. Así mismo especies pertenecientes a otros géneros de las β -*Proteobacteria* pueden llegar a ser identificadas erróneamente como *Burkholderia*.

Por otra parte se han generado estudios específicos para algunas especies en particular, por ejemplo a partir de la filogenia conocida para el año 2006 se generó un estudio para

grupos específicos del género *Burkholderia*, usando el gen *gyrB* para la identificación de tres especies en particular; *B. plantarii*, *B. gladioli* y *B. glumae* (Maeda y col., 2006). Consecutivamente, en otro estudio de análisis filogenéticos de los genes *rpoB*, *gyrB* y *rrs*, se utilizaron cepas de los géneros *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Comamonas*, *Delftia*, *Acidovorax*, *Brevundimonas*, *Herbaspirillum huttiense* y "*Pseudomonas butanovora*". En éste estudio se elucidó que los árboles genéticos fueron concordantes entre ellos mismos con la taxonomía reportada hasta al año en que se generó la investigación (Lineda y col., 2008). Es importante recalcar las diferencias obvias que se obtuvieron en un estudio mas reciente en el que se observan un par de agrupamientos filogenéticos (Figura 2) quedando organizados en un grupo A especies patógenas de humanos, animales y plantas y en un grupo B especies asociadas a plantas, benéficas y ambientales (PBE) (Suárez-Moreno y col., 2012).

Recientemente, en un estudio de análisis multilocus realizado con 77 cepas de referencia del género *Burkholderia*, se usaron los genes mantenimiento *atpD* subunidad beta de ATP sintasa), *gltB* (glutamato sintasa), *lepA* (factor 4 de elongación), y *recA* (proteína recA requerida en la recombinación homóloga y la reparación de daños por mutaciones en el ADN) incluida la secuencia codificante para 16S rRNA. El estudio reveló que, a medida que se han descrito nuevas especies, la aparición de nuevos linajes es consecuente. Adicionalmente, existe la propuesta de dividir el género *Burkholderia* debido a la presencia de dos grupos principales y en algunas ocasiones tres, con la presencia de *B. andropogonis* y *B. endofungorum/B. rhizoxinica* que se agrupan al extremo del grupo A y mostrando un porcentaje de diferencia con el grupo A y el grupo B mostrando que *B. endofungorum/B. rhizoxinica* tienen un porcentaje de similitud menor del 96% del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA teniendo valores de similitud del 96.1% con respecto al grupo B y del 95.1% comparado con el grupo A. Por otra parte *B. andropogonis* presenta valores de similitud del 95.5% con respecto al grupo B y del 93.8% con respecto al grupo A, esto evidencia que el género está evolucionando y creando diferentes linajes evidenciándose en estudios filogenéticos (Estrada-de-los-Santos y col., 2013). Generalmente, valores menores del 95% de similitud en las secuencias de la subunidad 16S rRNA indica la presencia de un género distinto (Tindall y col., 2010).

El estudio filogenético bioinformático (Sawana y col., 2014), toma como referencia 45 cepas de *Burkholderia* con genomas secuenciados y adicionalmente incluye 21 proteínas al análisis comparativo concatenado para la generación de un árbol filogenético. Los resultados obtenidos muestran una división notable de dos grandes clados tal como lo había descrito Suárez-Moreno (2012) en dos grandes grupos: patógenas y no patógenas (asociadas a plantas de forma benéfica y uso provechoso ambiental (PBE) por sus siglas en inglés “A plant-beneficial-environmental” (Figura 2). De este modo el primero de estos grupos denominado *Burkholderia*, el cual agrupa a las especies patógenas de animales, plantas y el humano; y por otro lado, el segundo clado, se propone denominarle *Paraburkholderia* gen nov. que alberga a las PBE, este clado a medida que se han descubierto nuevas especies es el que ha tenido mayor crecimiento en contraste con el clado *Burkholderia*. Una revisión reciente (Estrada-de-los-Santos, 2015) propone la separación de los dos grupos y nombrarlos de manera distintiva en dos géneros separados, manteniendo en las especies agrupadas en un clado con las especies PBE y la propuesta de cambiar el nombre de este clado por el de *Caballeronia* o *Paraburkholderia* siendo un nuevo género.

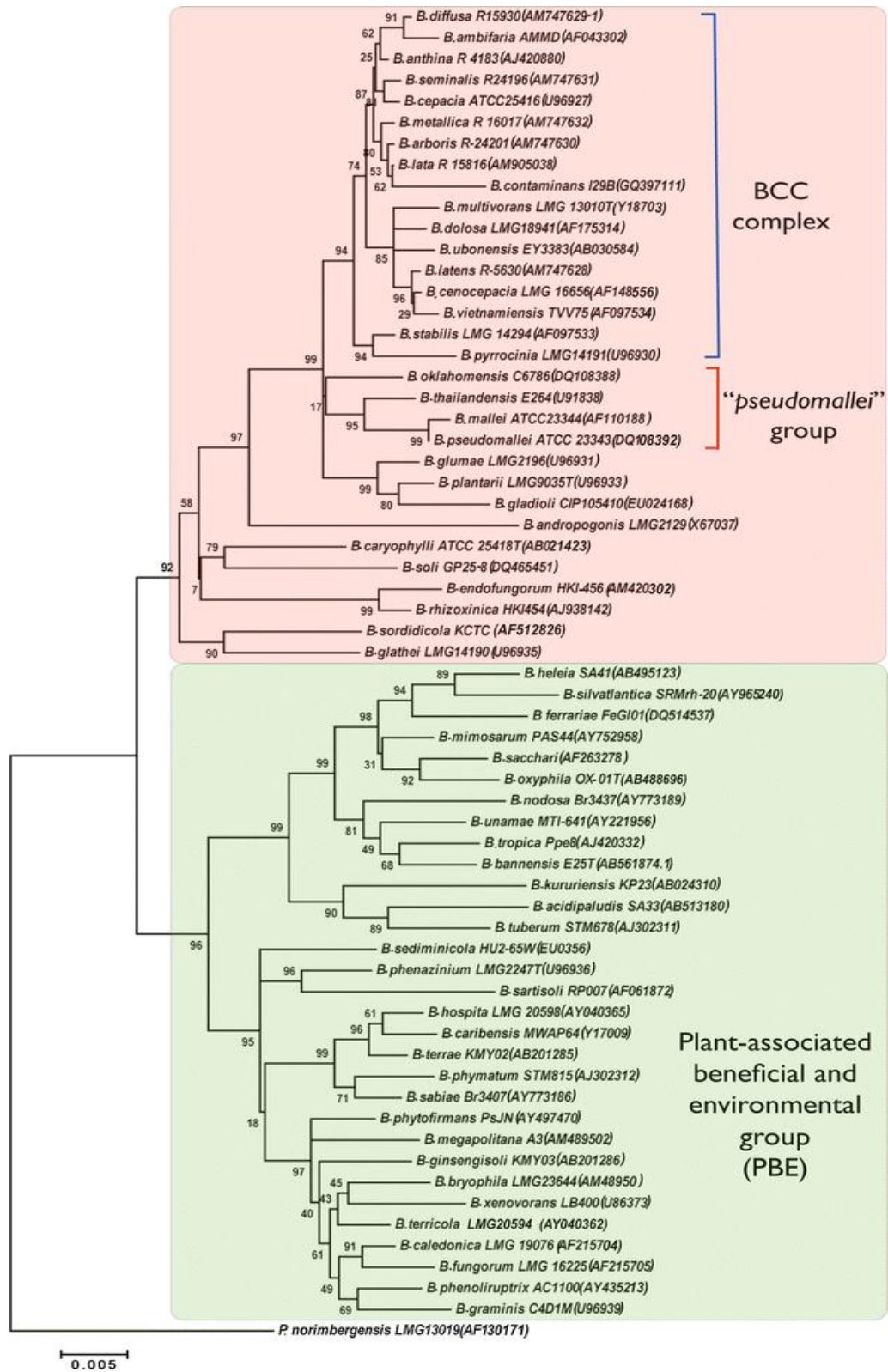


Figura 2. Árbol filogenético en based a secuencias 16S rDNA. Las secuencias fueron alineadas y como outgroup se utilizó a *Pandoraea norimbergensis* LMG13019. Éste árbol fue elaborado por el método Maximum-Likelihood y su historia evolutiva fue inferida por el método Neighbor-Joining. El número en cada nodo corresponde a el valor bootstrap. Se presenta en color rojo el clado de especies patógenas y en verde especies asociadas a plantas, benéficas y ambientales (PBE). (Suárez-Moreno y col. 2012)

Por lo que se refiere a las especies patógenas del género *Burkholderia*, el complejo *Burkholderia cepacia* (BCC), se encuentra formado por una colección de especies que son fenotípicamente similares pero genéticamente distintas. Estas especies presentan rangos de similitud del 98 al 100% en sus secuencias del ARN ribosomal 16S (Coenye & Vandamme, 2001). Este complejo comprendía 17 especies en el año 2011, muchas de ellas de importancia en el área clínica, como organismos oportunistas que algunas de éstas se han encontrado en pacientes con fibrosis quística y enfermedad crónica granulomatosa, actualmente este complejo está comprendido por un total de 20 especies (Hauser y col., 2011; Padrenas y col., 2016). Por otra parte, el grupo *pseudomallei* que incluye a cuatro especies, se encuentra también en la agrupación de especies patógenas afectando a humanos y animales. *B. mallei* es responsable de la una enfermedad contagiosa y letal que afecta a caballos, burros y mulas, conocida como la “enfermedad de Glanders” Se identifica por producir ulceraciones y nódulos en el tracto respiratorio alto y pulmones; pudiendo generar formas de nodulaciones cutáneas denominadas “muermo” (Singh y col., 2015). Adicionalmente, *B. pseudomallei* agente causal de la enfermedad llamada “melioidosis” presenta un cuadro clínico variado que puede ir desde abscesos localizados, posteriormente neumonía y finalmente septicemia.

Se encuentran dos especies más que están estrechamente relacionadas filogenéticamente dentro de este grupo *B. thailandensis* que generalmente es avirulenta, pero algunos casos esporádicos de pacientes han sido reportados en el Sureste de Asia y Estados Unidos de América y *B. oklahomensis* la cual fue aislada en 1973 a partir de un paciente que sufrió un accidente automovilístico en Oklahoma, E.U.A. y de la cual, no se conoce mucho al respecto. En cuanto a su virulencia en el ser humano, estudios realizados mostraron que es avirulenta en modelos animales (LiPuma, 2007; Glass, y col, 2006; McCormick y col., 1977; DeShazer, 2007 Currie y col., 2000).

Además de las especies reportadas como patógenas de humanos y animales, existen algunas especies que se conocen como especies patógenas de plantas tales como:

- a) *B. glumae*, agente causal de pudrición en plántulas y raíces de arroz (Goto & Ohata, 1956),
- b) *B. caryophylli*, la cual afecta a los claveles y provoca pudrición de la cebolla,
- c)

B. plantarii, patógena en raíces de plantas de arroz (Ballard y col., 1970; Palleroni, 1984) d) *B. andropogonis*, agente causal de “stripe disease” (aparición de rayas a lo largo de las plantas) en plantas sorgo y manchas foliares en plantas de frijol (Palleroni 1984). Es de importancia recalcar que la interacción de algunas especies parece restringida a un solo tipo de hospedero, mientras otras tienen un rango más amplio (Coenye & Vandamme, 2003).

En cuanto al grupo de las no patógenas están incluidas especies benéficas para plantas relacionadas con promoción de crecimiento fijando nitrógeno atmosférico con algunas especies representativas como *B. vietnamensis*, *B. kururiensis* (Estrada-de-los-Santos, 2001), *B. unamae*, *B. xenovorans* y *B. tropica* (Caballero-Mellado y col., 2004; Goris y col., 2004; Reis y col., 2004) así como especies nodulantes de leguminosas como *B. tuberum* y *B. phymatum* (Vandamme y col., 2002). En forma similar en la promoción del crecimiento de las plantas, la disminución a la exposición de etileno el cual se ha observado que puede disminuir la tasa de crecimiento de las plantas, algunas especies de *Burkholderia* como *B. vietnamensis* y *B. unamae* han podido crecer en medios con 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) el cual es un precursor inmediato del etileno, como única fuente de nitrógeno y se ha detectado la actividad desaminasa sobre ACC además del gen ACC desaminasa (*acdS*). Por otra parte en las especies *B. phymatum*, *B. xenovorans* y *B. caribiensis* (Onofre-Lemus y col., 2009) se ha detectado la producción de agentes antifúngicos y supresión de enfermedades en las plantas (Gillis y col., 1995; Li y col., 2002; Parke & Gurian-Sherman, 2001).

Determinadas especies pertenecientes al grupo de las no patógenas, se han estudiado recientemente con la propuesta de ser destinadas para procesos biotecnológicos, tales como biocontrol, biorremediación y promoción del crecimiento de plantas. No obstante, algunas de ellas también se les ha relacionado con infecciones en humanos, ya que están estrechamente relacionadas y pertenecen al BCC, infectando principalmente a enfermos con fibrosis quística (Coenye & Vandamme, 2003). Algunas especies de este grupo, tienen la capacidad de ser fijadoras de nitrógeno a través de la oxidación de amonio, y en algunos otros casos, relacionadas con el reciclaje de materia orgánica (Estrada-de-los-Santos y col., 2013).

Adicionalmente, se han descrito otras especies que son endófitas de plantas como: a) *B. phytofirmans* ubicada en las especies PBE (Figura 2) y que ha demostrado tener efectos positivos en la estimulación en el crecimiento de plantas de uva, papa y otros vegetales como maíz y pastisales (Sessistch y col., 2005); b) *B. tropica* que también ha demostrado una interacción y efecto benéfico con plantas de maíz, caña de azúcar y teosinte en México, Brasil y Sudáfrica (Reis y col., 2004); c) *B. unamae*, la cual es capaz de fijar nitrógeno y fue aislada a partir de la rizósfera de plantas de maíz y café en los estados de Veracruz, Morelos y Chiapas con climas semicálido subhúmedo, semicálido húmedo, cálido subhúmedo y cálido húmedo (Caballero-Mellado y col., 2004) y; d) *B. silvatlantica*, esta especie fue aislada de la rizósfera de maíz y hojas de caña de azúcar cultivadas en Río de Janeiro, Brasil (Perin y col., 2006).

Sin embargo, se encuentran algunas especies BCC como *B. ambifaria*, *B. cenocepacia*, *B. pyrrocinia* y *B. vietnamiensis* que son capaces de inhibir el crecimiento de algunos hongos patógenos de plantas (cacahuates, chicharos, arroz y pastisales) como *Phytium ultimum*, *Gusarium oxysporum* y *Sclerotium rolfsii* (Chiarini y col., 2006).

El uso y explotación industrial o agrícola orientado en su probalbe potencial biotecnológico de algunas especies bacterianas se sigue estudiando. En el caso de biorremediación, *Burkholderia* sp. cepa GB-01 tiene la capacidad de degradar abamectina, antiparasitario utilizado en cultivos y plantas ornamentales. Este compuesto es toxico para otras especies dispersas en el ambiente que no son blanco y aunque el proceso aún debe ser optimizado, podría ser util en suelos contaminados con abamectina (Waseem y col., 2011).

La cepa *Burkholderia* sp. RKJ800 tiene también un alto potencial biotecnológico en la degradación de 4-cloro-2-aminofenol. Este compuesto es usado en la industria cosmetológica como tinte para el cabello y se clasifica como una sustancia toxica por su potencial mutagénico. Existen evidencias experimentales que lo reportan como un contaminante liberado y detectado en el suelo y agua debido a las actividades industriales (Kumar y col., 2013).

Otro ejemplo de especies con potencial biotecnológico, es la cepa LB400 de *B. xenovorans*, la cual es considerada como una de las más importantes degradadoras de bifenilos policlorados (PCB) degradando más de 20 compuestos relacionados a los PCB (Bedard y col., 1986).

A. ANTECEDENTES EN MÉXICO

En nuestro país se ha mostrado interés por especies bacterianas con potencial biotecnológico en diversos ámbitos, como por ejemplo, en promoción del crecimiento de plantas y entre uno de los procesos destaca la fijación de nitrógeno, resultando de gran atención especies del género *Burkholderia*. Perin y colaboradores (2006) reportaron la búsqueda de especies asociadas a caña de azúcar y maíz con el diseño de oligonucleótidos específicos basados en la amplificación del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA que ayudan a distinguir a especies con posibles propiedades simbióticas de fijación de nitrógeno, obteniéndose mayoritariamente a *Burkholderia unamae* en asociación en plantas de caña de azúcar. Además, se le ha encontrado a esta especie en plantas como maíz, y café en los estados de Veracruz, Chiapas y Morelos destacando la presencia de esta especie en climas que van desde semicálido subhúmedo a cálido húmedo y no así en climas semicálidos a secos con una oscilación de aislamiento en el pH de 4.5 a 7.1 (Caballero-Mellado y col., 2004).

B. tropica se ha reportado que se encuentra en asociación con plantas de teosinte y caña de azúcar (Reis, y col., 2004) y con mayor frecuencia de asociación a plantas de maíz (Perin y col., 2006). Asimismo se demostró que plántulas inoculadas con *B. tropica* MTo-293 llevó a la colonización efectiva de raíces de plantas de tomate, seguido del traslado y establecimiento de bacterias en los tejidos aéreos. Esta colonización significativa fue acompañada por un aumento constante en la producción agrícola de tomate, bajo condiciones de invernadero (Bernabeu, y col., 2015).

Con respecto a otras *Burkholderia*, en nuestro país aislamientos como por ejemplo, *B. kururiensis* y *B. vietnamiensis*. Estas dos especies fijadoras de nitrógeno se han encontrado asociadas a plantas de café (Estrada-de-los-Santos y col., 2001). Además, en plantas de tomate, maíz y caña de azúcar se ha aislado a *B. unamae* y en plantas de maíz

y caña de azúcar a *B. tropica*., Se conoce un par de genes relacionados con transmisibilidad genética y que se ubican especialmente y de forma restringida en muestras patógenas oportunistas del BCC, los genes *cbIA* y *esmR* y éstos no se encuentran en el genoma de *B. tropica* y *B. unamae*, implica la no patogenicidad de estas cepas (Perin y col, 2006).

Se sabe que *Burkholderia* puede ser aislada en cuerpos de agua y en un esfuerzo tecnológico en la reducción de los efectos negativos de carbazol y sus derivados en el Estado de Michoacán, la cepa de *Burkholderia* sp. IMP5GC demostró poder hacer uso del carbazol - compuesto tricíclico aromático que está naturalmente presente en la creosota de alquitrán de hulla (biocida protector de la madera), petróleo crudo, destilados de esquisto bituminoso, petróleo y sus derivados. La cepa *Burkholderia* sp. IMP5GC fue aislada en las aguas termales “Los Azufres” de dicho estado (Castorena, y col., 2006).

Recientemente, se realizó un estudio basado en la búsqueda de especies *Burkholderia* en el Estado de Tamaulipas, obteniendo un total de 1461 aislamientos bajo la metodología microbiológica empleada, de los cuales sólo cinco de ellos se confirmaron como *Burkholderia* mediante métodos moleculares. Los cinco aislamientos se obtuvieron a partir de plantas de agave y maíz, y se identificaron como *B. gladioli* y miembros del BCC por secuencia del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA (Vacaseydel Aceves, 2012).

En el estado de Nayarit se aisló a *B. tuberum* cepa CCGE1002 a partir de un nódulo colectado de *Mimosa occidentalis*. Esta cepa contiene alrededor de 190 secuencias codificantes que se encuentran en relación de la degradación de compuestos aromáticos, aunado a esto se encontró que contiene genes relacionados con la fijación de nitrógeno y nodulación (Ormeño-Orrillo, y col., 2012).

En 2011 en cultivos cercanos a la cuenca del Papaloapan y a partir de una planda de piña se aisló a la cepa *B. gladioli* UAPS07070, se logró demostrar la actividad antagonista *in vitro* contra *Tatumella ptyseos*, agente causal de la enfermedad conocida como “pink disease” que causa una coloración café-naranja producto de metabolitos del gluconato y que se observan en la fruta ya enlatada que ha sido sometida a temperaturas de

pasteurización, esto presenta grandes pérdidas económicas para la industria que se encarga de este proceso (Marín-Cevada y col., 2012).

En nuestro grupo de investigación, recientes trabajos de tesis realizados en el Estado de Puebla en torno a la ecología de *Burkholderia* spp. han demostrado la posible presencia del género de estudio en diversos hábitats. Recientemente, el trabajo de tesis de Antonio-Flores reportó el aislamiento de 338 cepas utilizando un medio de cultivo semi-selectivo y finalmente obtuvo 83 cepas con posibilidad a pertenecer al género de estudio a través de técnicas microbiológicas y moleculares semi-selectivas. Así mismo, el trabajo de tesis de Vega-Aguilar en 2016 reportó 234 aislamientos, de los cuales finalmente 10 cepas fueron identificadas con base a pruebas moleculares como *Burkholderia* sp. Los muestreos se realizaron en diversas regiones de nuestro Estado con diferencias climáticas importantes. Las regiones que se tomaron de acuerdo al tipo de clima en conjunto de los dos trabajos son: cálido subhúmedo, templado subhúmedo, seco-semiseco, templado húmedo y cálido húmedo.

La colección de muestras proviene de la rizósfera de diferentes plantas de interés agrícola como: maíz, papa, alfalfa, haba, maguey, nopal, plátano, café, blueberry, conocido como arándano, ajo, chile canario, nuez, naranja. Asimismo se obtuvieron muestras rizosféricas de plantas silvestres tales como helechos, pastizales, bromelias, pinos, encinos y leguminosas, cabe aclarar que en la totalidad de los aislamientos las plantas estaban sanas. Además de tomar muestras de cuerpos de agua (Embalse de Valsequillo, laguna de Chignahuapan y presa La Luz en el municipio de Chignahuapan).

III. Planteamiento del problema.

El género *Burkholderia* comprende un número extenso y creciente de especies que se han ido incorporando con gran velocidad. Se conoce en gran medida acerca de la ubicuidad de *Burkholderia*, sin embargo se conoce poco sobre su presencia asociada con su hospedero y factores ambientales que pudiesen influenciar en su distribución geográfica.

Así mismo, la importancia de este género es muy sustancial en el área clínica, no solo por que puedan ser agentes infecciosos o bacterias oportunistas en humanos, animales o plantas, sino también, porque algunas especies que tienen potencial biotecnológico y no existen muchos estudios en torno a ello.

IV. Justificación.

Con base a que las especies del género *Burkholderia* tienen la capacidad de colonizar y establecerse en diferentes hábitats, en este estudio se propone determinar la presencia del género *Burkholderia* a partir de aislamientos obtenidos en diferentes puntos geográficos del Estado de Puebla, considerando la variabilidad climática del estado y pensando en la escasas de estudios generados a nivel nacional y la nulidad de reportes para el Estado de Puebla. Este estudio contribuirá al conocimiento sobre la presencia de éste género, su interacción con su hospedero en diferentes hábitats del Estado de Puebla y probablemente, dará a conocer nuevas especies aún no reportadas.

V. Objetivos

A. General.

Determinar la diversidad genética y filogenia del género *Burkholderia* a partir de aislamientos obtenidos en diferentes regiones del estado de Puebla.

B. Objetivos particulares.

1. Identificar molecularmente a los aislados de *Burkholderia* con base en el marcador molecular 16S rDNA.
2. Calcular con base a las secuencias del marcador molecular 16S rDNA la diversidad genética con el índice de diversidad nucleotídica.

VI. Material y métodos.

A. Reactivación de cepas.

Se reactivó un cepario comprendido por 96 aislamientos con potencial de pertenecer al género *Burkholderia* obtenidos por Antonio-Flores (2014) y Vega-Aguilar (2016) a partir de diferentes hábitats y hospederos en el Estado de Puebla. Las cepas habían sido conservadas en glicerol (25%) y almacenadas a una temperatura de -76°C (Tabla 1). La reactivación se llevó a cabo en medio LB, y a su vez, se verificó la supervivencia y pureza de los cultivos. Además, es importante recalcar que el origen de las muestras es variado (clima, pH, tipo de suelo) así como la diversidad de los orígenes de los aislamientos existiendo rizósfera de diferentes plantas silvestres y cultivos agrícolas, así como de cuerpos de agua. Se eligieron diferentes zonas del Estado de Puebla, basándose en la diversidad climática, afectada por la altitud, latitud, incluyendo la geografía que presenta. Las cepas provienen de las siguientes zonas geográficas: La Paz Tlaxcolpan, San José del Rincón, San Miguel Atlapulco, Chignahuapan, Reserva de la biósfera Tehuacán-Cuicatlán, Tenampulco, Cuetzalan, Tlatlauquitepec y Citlaltépetl o Pico de Orizaba (San Miguel Zoapan, Tlachichuca) (Figura 3). Así mismo, es importante mencionar que las zonas geográficas elegidas presentan diferentes climas: seco, semiseco, templado subhúmedo, templado húmedo, cálido húmedo y frío subhúmedo (Fig. 4)



Grupo	Clave	Lugares
Grupo A	GA	La Paz Tlaxcolpan, San José del Rincón, San Miguel Atlapulco
Grupo B	GB	Chignahuapan
Grupo C	GC	Reserva de la biósfera Tehuacán-Cuicatlán
Grupo D	D	Tenampulco, Cuetzalan, Tlatlauquitepec
Grupo E	E	Citlaltépetl o Pico de Orizaba (San Miguel Zoapan, Tlachichuca)

Figura 3. Zonas geográficas en donde se realizaron los muestreos en el Estado de Puebla. En la tabla se encuentran las zonas descritas mapa y la nomenclatura para cada uno de los grupos.

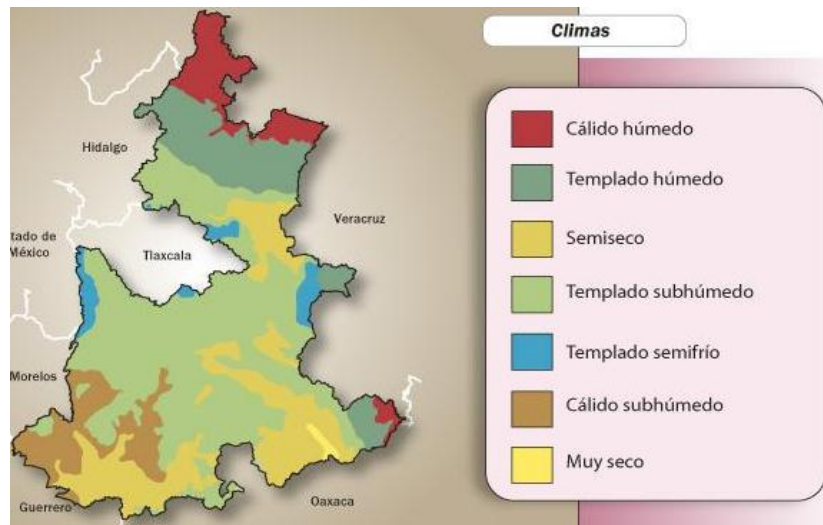


Figura 4. Mapa que describe la diversidad de climas en la extensión geográfica del Estado de Puebla.

Tabla 1. Información de los aislamientos reactivados a partir del cepario que está comprendido por los grupos A, B, D y E. Se muestra la clave de la cepa, zona geográfica, origen, el clima, pH de la muestra y la altitud en metros sobre el nivel del mar.

GRUPO A						
Nº	Cepa	Zona geográfica	Origen	Clima	pH	Altitud (MSNM)
1	GA01	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	2095
2	GA03	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	2095
3	GA04	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	2095
4	GA06	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	2095
5	GA07	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	2095
6	GA10	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	2095
7	GA17	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	2095
8	GA18	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	2095
9	GA23	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	2095
10	GA29	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	Seco/semiseco	5.2	2095
11	GA32	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Seco/semiseco	7.3	1660
12	GA33	San José del Rincón	Rizósfera alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Seco/semiseco	7.5	2060
13	GA35	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Seco/semiseco	7.3	1660
14	GA36	San Miguel Atlapulco	Rizósfera helecho (<i>Filicopsida</i>)	Seco/semiseco	7.3	1660
15	GA45	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de palma (<i>Brahea</i> sp.)	Seco/semiseco	7.3	1660
16	GA46	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de palma (<i>Brahea</i> sp.)	Seco/semiseco	7.3	1660
17	GA54	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de palma (<i>Brahea</i> sp.)	Seco/semiseco	7.3	1660
18	GA58	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de leguminosa (<i>Fabaceae</i>)	Seco/semiseco	7.3	1660
19	GA59	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de leguminosa (<i>Fabaceae</i>)	Seco/semiseco	7.3	1660

20	GA69	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de leguminosa (<i>Fabaceae</i>)	Seco/semiseco	7.3	1660
21	GA2B	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de leguminosa (<i>Fabaceae</i>)	Seco/semiseco	7.3	2095
22	GA51B	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de palma (<i>Brahea</i> sp.)	Seco/semiseco	7.3	1660
23	GA58B	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Seco/semiseco	7.3	1660
24	GA62B	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de encino (<i>Quercus</i> sp.)	Seco/semiseco	6.5	2095
25	GA69B	San José del Rincón	Rizósfera de agave (<i>Agave</i> sp.)	Seco/semiseco	7.4	2060
26	GA72B	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de nopal (<i>Opuntia</i> sp.)	Seco/semiseco	6.5	2095
27	GA74B	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de nopal (<i>Opuntia</i> sp.)	Seco/semiseco	6.5	2095
28	GA75B	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Seco/semiseco	7.3	1660
29	GA125B	San José del Rincón	Rizósfera de alfalfa <i>Medicago sativa</i>)	Seco/semiseco	7.5	2060
30	GA133B	San José del Rincón	Agua (Presa Valsequillo)	Seco/semiseco	8.1	2060
31	GA143B	San José del Rincón	Agua (Presa Valsequillo)	Seco/semiseco	8.1	2060
32	GA145B	La Paz Taxcolpan	Rizósfera de encino (<i>Quercus</i> sp.)	Seco/semiseco	6.5	2095
33	GA166B	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de palma (<i>Brahea</i> sp.)	Seco/semiseco	7.3	1660

GRUPO B

Nº	Cepa	Sitio geográfico	Origen	Clima	pH	Altitud (MSNM)
34	GB01	Chignahuapan	Laguna Agua	Templado subhúmedo	7.63	2290
35	GB02	Chignahuapan	Laguna Agua	Templado subhúmedo	7.63	2290
36	GB11	Chignahuapan	Planta orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Templado subhúmedo	5.77	2290
37	GB13	Chignahuapan	Planta orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Templado subhúmedo	5.77	2290
38	GB16	Chignahuapan	Planta orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Templado subhúmedo	5.77	2290
39	GB18	Chignahuapan	Rizósfera de maguey (<i>Agave</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.88	2290

40	GB23	Chignahuapan	Rizósfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	4.81	2290
41	GB25	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290
42	GB28	Chignahuapan	Rizósfera de maguey (<i>Agave</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.88	2290
43	GB33	Chignahuapan	Suelo de la laguna/maíz (<i>Zea mays</i>)	Templado subhúmedo	6.05	2290
44	GB34	Chignahuapan	Suelo de la laguna/maíz (<i>Zea mays</i>)	Templado subhúmedo	6.05	2290
45	GB35	Chignahuapan	Suelo de la laguna/maíz (<i>Zea mays</i>)	Templado subhúmedo	6.05	2290
46	GB42	Chignahuapan	Rizósfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	5.51	2290
47	GB45	Chignahuapan	Rizósfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	5.51	2290
48	GB51	Chignahuapan	Rizósfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	5.51	2290
49	GB53	Chignahuapan	Rizósfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	5.51	2290
50	GB62	Chignahuapan	Rizósfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	Templado subhúmedo	5.51	2290
51	GB70	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.18	2290
52	GB73	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.18	2290
53	GB81	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.18	2290
54	GB84	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.18	2290
55	GB87	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.18	2290
56	GB90	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.18	2290
57	GB91	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.18	2290
58	GB93	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.18	2290
59	GB94	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.18	2290
60	GB98	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.18	2290
61	GB99	Chignahuapan	Rizósfera de Maguey (<i>Agave</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.88	2290
62	GB100	Chignahuapan	Rizósfera de Maguey (<i>Agave</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.88	2290

63	GB121	Chignahuapan	Rizósfera de Maguey (<i>Agave</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.77	2290
64	GB124	Chignahuapan	Rizósfera orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Templado subhúmedo	5.77	2290
65	GB125	Chignahuapan	Rizósfera orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Templado subhúmedo	5.77	2290
67	GB127	Chignahuapan	Rizósfera orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Templado subhúmedo	5.77	2290
68	GB130	Chignahuapan	Rizósfera orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Templado subhúmedo	5.77	2290
69	GB137	Chignahuapan	Rizósfera de bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.77	2290
70	GB148	Chignahuapan	Rizósfera de bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.77	2290
71	GB148A	Chignahuapan	Rizósfera de bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.77	2290
72	GB152	Chignahuapan	Rizósfera de bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.77	2290
73	GB155	Chignahuapan	Musgo/Planta/mini helecho	Templado subhúmedo	4.81	2290
74	GB156	Chignahuapan	Musgo/Planta/mini helecho	Templado subhúmedo	4.81	2290
75	GB169	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290
76	GB177	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290
77	GB183	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290
78	GB185	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290
79	GB190	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290
80	GB193	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290
81	GB196	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290
82	GB197	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290
83	GB203	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.21	2290

GRUPO D

Nº	Cepa	Sitio geográfico	Origen	Clima	pH	Altitud (MSNM)
84	D328	Cuetzalan	Rizósfera Blueberry (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	Cálido húmedo	6.25	1621
85	D335	Cuetzalan	Rizósfera Chile canario (<i>Capsicum pubescens</i>)	Cálido húmedo	5.54	1619
86	D335	Cuetzalan	Rizósfera Chile canario (<i>Capsicum pubescens</i>)	Cálido húmedo	5.54	1619
87	D409	Cuetzalan	Rizósfera Café (<i>Coffea</i> sp.)	Cálido húmedo	4.7	1597
88	D411	Cuetzalan	Rizósfera Café (<i>Coffea</i> sp.)	Cálido húmedo	4.7	1597
89	D416	Cuetzalan	Rizósfera de ajo (<i>Allium sativum</i>)	Cálido húmedo	5.2	1522
90	D422	Cuetzalan	Rizósfera de orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Cálido húmedo	4.97	1520
91	D424	Cuetzalan	Rizósfera de orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	Cálido húmedo	4.97	1520
92	D425	Cuetzalan	Rizósfera de alcatraz (<i>Zantedeschia</i> sp.)	Cálido húmedo	4.91	1520
93	D433	Tlatlauquitepec	Tierra de cultivo de papa	Templado subhúmedo	5.96	1920

GRUPO E

Nº	Cepa	Sitio geográfico	Origen	Clima	pH	Altitud (MSNM)
94	E80	Citlaltépetl	Rizósfera de mimosa	Frío subhúmedo	5.15	3573
95	E127	Citlaltépetl	Hongo Grande	Frío subhúmedo	5.74	3421
96	E133	Citlaltépetl	Hongo Chico	Frío subhúmedo	5.15	3432

B. Identificación Molecular.

1. Amplificación del gen ribosomal 16S utilizando oligonucleótidos semi-específicos.

Una vez comprobada la pureza y supervivencia de los cultivos, se elaboró una suspensión celular con una o dos asadas del cultivo en agua destilada estéril, etiquetadas y sometidas bajo las técnicas que se describen a continuación.

Para llevar a cabo la identificación preliminar se utilizaron los oligonucleótidos específicos para el género *Burkholderia*, se amplificó por la técnica de PCR un fragmento del gen ribosomal 16S utilizando los oligonucleótidos Bf y Br (Tago y col., 2014) con una concentración de 10 pmol/ μ l por reacción con volumen final de 8 μ L usando 1 μ L de cada primer y un volumen 1X de PCR Master Mix (Thermo Scientific), 1 μ l de suspensión de células y 1 μ l de agua tridestilada. Se siguió el siguiente protocolo de amplificación en termociclador (Thermo Scientific), siguiendo las condiciones mostradas (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de amplificación para los oligonucleótidos Bf y Br.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	1 minuto	
58°C	1 minuto	30 ciclos
72°C	1 minuto	
72°C	10 minutos	1 ciclo

2. Amplificación BOX-PCR.

Esta técnica consiste en la obtención de perfiles de bandeo originados por la distribución de secuencias de repetidos y distribuidas en el genoma en regiones extragénicas que además son de diferentes tamaños denominados BOX, es una variante de las técnicas REP-PCR “finger printing” en la que se consigue una sensibilidad a nivel intra-especie con el fin de eliminar clonas y reducir el número de muestras para posteriormente secuenciar el gen ribosomal 16S. Se utilizó el oligonucleótido llamado BOXA1R (5´ CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3´) añadiendo 1 µL del primer en concentración de 32 pmol/µL, 4 µL 1X de PCR Master Mix (Thermo Scientific), 1 µl de células suspendidas en 2 µl de agua tridestilada para un volumen final de 8 µL para cada reacción (Louws y col., 1994) bajo el programa que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de amplificación para el ensayo BOX-PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	7 minutos	1 ciclo
95°C	1 minuto	
52°C	1 minuto	35 ciclos
72°C	3 minuto	
72°C	10 minutos	1 ciclo

Se realizó una electroforesis a 95 V utilizando SuperBuffer (Zhang y col., 2011). Los productos de la amplificación y el marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific) se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%. Las bandas resultantes se tiñeron, visualizaron y se fotografiaron en un transiluminador UV.

3. Detección de cepas con oligonucleótidos GB-F GBN-2R, cepas patógenas para plantas o pertenecientes al complejo cepacia por medio de la técnica de PCR.

Mediante un proceso de selección de diferentes pares de oligonucleótidos, se obtuvo una agrupación de cepas que presuntivamente pertenecen al grupo BCC, patógenas de plantas o posibles fijadoras de nitrógeno. Para el primer grupo se utilizaron los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R, los cuales amplifican un fragmento de 1025 pb del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA para detección de especies que posiblemente sean fijadoras de nitrógeno debido al diseño de los oligonucleótidos que amplifican para *Burkholderia* spp. diazotróficas y no diazotróficas con un porcentaje de identidad mayor o igual al 97% con especies diazotróficas del mismo género (Perin y col., 2006) ; glu-FW, glu-RV, pla-FW, pla-RV, gla-FW y gla-RV para especies patógenas de plantas: *B. gladioli*, *B. plantarii* y *B. glumae* generando fragmentos de amplificación de 529, 597 y 479 pares de bases respectivamente, este ensayo fue del tipo PCR múltiple (Maeda y col., 2006). Por último, un par de oligonucleótidos BCR1 y BCR2a con un fragmento de amplificación de 1043 para la detección de especies pertenecientes al complejo cepacia (Mahenthiralingam y col., 2000). Las concentraciones de oligonucleótidos se manejaron según los autores y el origen del DNA templado es a partir de cultivo fresco (suspensión celular). Los genes blanco, temperaturas de alineamiento y tamaño de amplificado se muestran en la Tabla 4. Los programas para la realizar la técnica de PCR se llevó a cabo según el tipo de oligonucleótido utilizado se muestra en la Tabla 5.

Tabla 4. Oligonucleótidos, temperatura de alineamiento y tamaño de amplificado.

Gen	Grupo	Nombre del templado	Secuencia 3'→5'	Tm	Tamaño amplicón	Referencia.
16S rRNA	Gen. <i>Burkholderia</i> .	Bf	TAGCCCTGCGAAAGCCG	58°C	463pb	(Tago y col., 2014)
		Br	GCCAGTCACCAATGCAG			
16S rRNA	<i>Probables fijadoras de nitrógeno.</i>	GB-F	AGTAATACATCGAACRTGT	60°C	1025pb	(Perin y col., 2006)
		GBN-2R	GCTCTTGCGTAGCAACTAG			
gyrB	<i>B. gladioli, B. plantarii, B. glumae</i>	glu-FW	GAAGTGTCGCCGATGGAG	63°C	529pb	(Maeda , y col., 2006)
		glu-RV	CCTTCACCGACAGCACGCAT			
		pla-FW	TCGAGCTGGCTGCGCCTC		597pb	
		pla-RV	GTCGTCGCCCGAGGTCTCG			
		gla-FW	CTGCGCCTGGTGGTGAAG		479pb	
		gla-RV	CCGTCCCCTGCGGAATA			
recA	Complejo cepacia	BCR1	TGACCGCCGAGAAGAGCAA	63°C	1043pb	(Mahenthalingam y col., 2000)
		BCR2a	CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC			

Tabla 5. Condiciones de amplificación para oligonucleótidos específicos para especies con probable potencial de fijación de nitrógeno, patógenas de plantas y pertenecientes al complejo cepacia.

Probables fijadoras de nitrógeno.			Patógenas de plantas (<i>B. gladioli</i> , <i>B. plantarii</i> , <i>B. glumae</i>)			Burkholderias pertenecientes al complejo cepacia.		
Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 minutos	1 ciclo	96°C	2 minutos	1 ciclo	96°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	30 segundos	30 ciclos	96°C	45 segundos	35 ciclos	96°C	1 minuto	30 ciclos
60°C	45 segundos		63°C	45 segundos		63°C	1 minuto	
72°C	1 minuto		72°C	1 minuto		72°C	1.5 minutos	
72°C	10 minutos	1 ciclo	72°C	10 minutos	1 ciclo	72°C	10 minutos	1 ciclo

C. Amplificación del gen ribosomal 16S.

Se utilizaron los oligonucleótidos universales 27F (Lane y col., 1991) y 1492R (Weisberg y col., 1991) para amplificar el gen ribosomal 16S. El volumen final de cada reacción de PCR fue de 50 μ L, se usaron los oligonucleótidos a una concentración de 30 pmol/ μ L añadiendo 2 μ L de cada uno, 5 μ L de suspensión celular, 0.75 μ L de dNTPs 2 mM, 0.25 μ L de Dream Taq DNA Polymerase (1.25 U), 1X de Dream Taq Buffer (Thermo Scientific) y 35 μ L de agua libre de DNAsas y RNAsas. El programa utilizado se describe en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de amplificación para el ensayo BOX-PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	1 minuto	
58°C	1 minuto	30 ciclos
72°C	1:30 minutos	
72°C	10 minutos	1 ciclo

D. Purificación de los Productos de PCR.

El producto de PCR del gen 16S rDNA de las cepas con potencial a pertenecer al género *Burkholderia* fueron visualizados en el gel y luego, se procedió a cortar la banda correspondiente al tamaño del amplicón (1.4kb aprox.). Posteriormente, se colocó el fragmento en un tubo Eppendorf de 1.5 mL que fue previamente pesado para saber el peso del gel que contiene el producto de nuestro interés. Luego, se continuó con la adición de tres volúmenes de NaI 6 M con respecto al peso del gel, se llevó a esta preparación a calentamiento a 65°C hasta que el gel se fundió. Se agregaron 10 μ L de suspensión de sílica, esta preparación se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos con agitaciones esporádicas para la resuspensión de las partículas de sílica.

Después se centrifugó la preparación para descartar posteriormente el sobrenadante y conservar la pastilla, ésta se sometió a tres lavados con solución “New Wash” 1X con tiempo de centrifugación de 1 minuto entre cada ciclo de lavado. Finalmente la pastilla se sometió a proceso de secado retirando la mayor parte posible de líquido y posteriormente puesto a una temperatura de 37°C durante una hora aproximadamente o hasta que la pastilla se desprendiera del fondo del tubo. Una vez seca la pastilla se resuspendió con 50 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas, se centrifugó por última vez un tiempo de 3 minutos para la posterior separación del sobrenadante y éste se colocó en un tubo nuevo y limpio para la posterior medición de la concentración de DNA en NanoDrop (Thermo Scientific).

E. Secuenciación de productos purificados.

Cada reacción para la secuenciación contenía 120 ng de ADN y 10 pmoles del oligonucleótido, en un volumen de 16 µL. La secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en el departamento de Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (Cuernavaca, Mor.).

F. Análisis de fragmentos secuenciados.

Las secuencias obtenidas del gen ribosomal 16S se compararon a través del programa BLASTn, que contrasta la secuencia de nucleótidos desconocida con una base de datos de secuencia de nucleótidos mostrando un listado de aquellas que presentan mayor similitud (Brenner, 1995). Las secuencias generadas por las cepas de estudio, así como las de las cepas tipo se alinearon utilizando el programa Clustal X BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (Hall, 1999).

G. Construcción de árbol filogenético con base al gen ribosomal 16S.

El análisis de datos y secuencias se realizó con el programa MEGA versión 6.0 (Tamura y col., 2013) y con él se obtuvieron los árboles filogenéticos con el método de Neighbor-Joining y un análisis bootstrap de 1000 repeticiones.

H. Diversidad genética con base a diversidad nucleotídica.

El cálculo de este índice se realizó con el programa DNAsp versión 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) evaluando la variación entre las secuencias con el valor del índice π . Se evaluaron un total de 47 secuencias con un total de bases de 1287 en los que se excluyeron los “gaps” de las secuencias obtenidas del gen que codifica para la subunidad 16S ribosomal.

VII. Resultados y discusión.

A. Selección de cepas con potencial a pertenecer al género *Burkholderia* con el uso de los oligonucleótidos Bf y Br.

Partiendo de las 96 cepas con potencial a pertenecer al género *Burkholderia*, se amplificó el fragmento esperado de 463 pb utilizando los oligonucleótidos semi-específicos Bf y Br (Tago y col., 2014). Se obtuvieron 77 cepas con la banda esperada. En la Figura 5 podemos apreciar un gel que nos ejemplifica lo descrito.

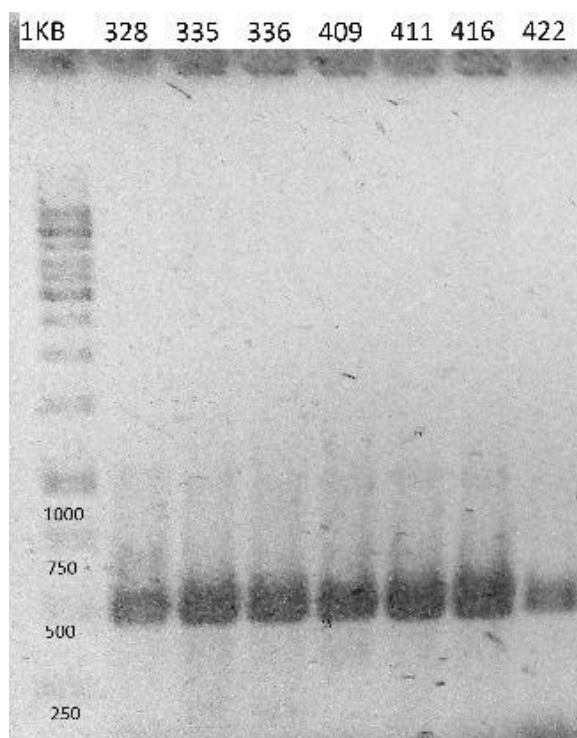


Figura 5. Productos de PCR de algunas cepas del grupo D donde se aprecia el amplificado del tamaño esperado de 463pb con el uso de los oligonucleótidos Bf y Br.

Cabe destacar que la afinidad de los oligonucleótidos Bf y Br tienen aún un margen de inespecificidad dado que originalmente se estimó posterior a la eliminación de clonas

con la metodología BOX-PCR que serían 64 cepas en total pertenecientes al género, y de éstas muestras finalmente en seguida de la secuenciación se obtuvieron algunos amplificados con el peso esperado pero los aislamientos fueron descartados debido a la identificación con otros géneros como *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* teniendo finalmente un aproximado de 80% de especificidad sobre el género *Burkholderia*.

B. BOX-PCR

La amplificación del DNA bacteriano por esta técnica y la generación de diferentes perfiles de amplificación contribuyó, con base a los patrones generados en el ensayo de electroforesis, a reducir el número de cepas a secuenciar eliminando de esta manera las posibles clonas y, por lo tanto, un total de 64 cepas fueron seleccionadas para ser secuenciadas. El criterio de selección que se utilizó para considerarlas como clonas fue el que exhibieran perfiles de bandeo similares y pertenecieran a especies aisladas en el mismo punto geográfico y fuente de origen. En la Figura 5 se observan los diferentes perfiles de bandeo de las cepas pertenecientes al grupo D y se observa la heterogeneidad del grupo sin tener perfiles similares.

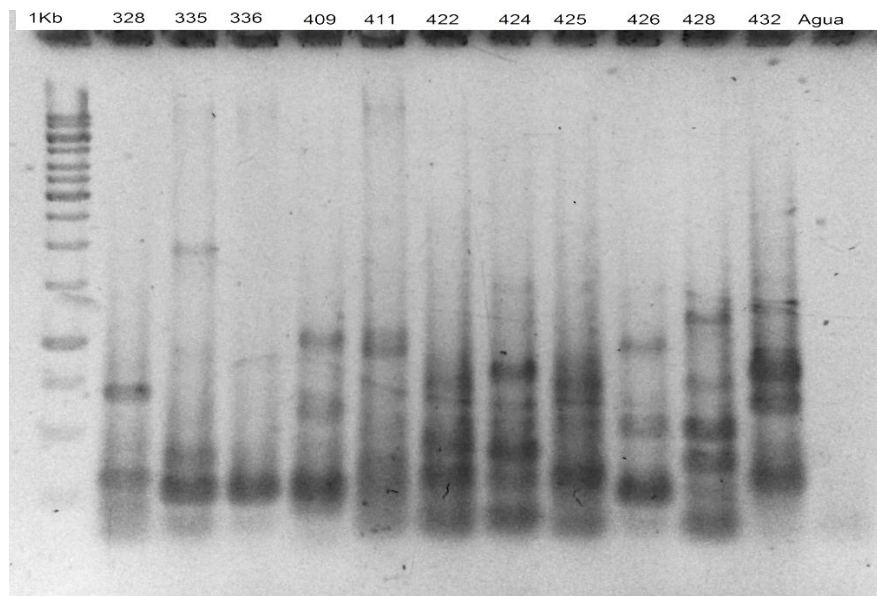


Figura 5. BOX-PCR de cepas integrantes del grupo D, en el primer carril se observa el marcador de peso molecular, en cada uno de los carriles se distingue el número de la cepa correspondiente al grupo.

C. Detección de especies pertenecientes al BBC

Las 77 cepas previamente seleccionadas utilizando los oligonucleótidos semi-específicos Bf y Br, fueron analizadas bajo el protocolo descrito por Mahenthiralingam y col. (2000) para amplificar un fragmento del gen *recA* de (1043pb), que evidencia a especies pertenecientes al BCC. Se obtuvo un total de cuatro cepas positivas para este ensayo, una de ellas pertenece al grupo A y las tres restantes al grupo D (Tabla 7).

Tabla 7. Especies identificadas que pertenecen al BCC con el uso de los oligonucleótidos BCR1 y BCR2a

Cepa	Sitio Geográfico	Origen	pH	Clima
GA10	La Paz Tlaxcolpan	Rizósfera maíz (<i>Zea mays</i>)	5.2	Seco/semiseco
D335	Cuetzalan	Rizósfera Chile canario (<i>Capsicum pubescens</i>)	5.54	Cálido húmedo
D336	Cuetzalan	Rizósfera Chile canario (<i>Capsicum pubescens</i>)	5.54	Cálido húmedo
D411	Cuetzalan	Rizósfera Café (<i>Coffea</i> sp.)	4.7	Cálido húmedo

En la Figura 6 se muestra un gel de tres cepas que nos dieron el amplificado esperado, estas cepas corresponden a aislamientos del grupo D originario de la región de Cuetzalan, para este proceso se utilizaron los oligonucleótidos BCR1 y BCR2a (Mahenthiralingam y col., 2000). Siendo las fuentes de aislamiento, rizósfera de plantas de maíz para la cepa GA10, chile canario para las cepas D335 y D336, y café para la cepa D411. La cepa D411 está relacionada con *B. arboris* y el aislamiento de esta especie se realizó de muestras clínicas de pacientes con fibrosis quística y muestras ambientales como en el caso de la cepa tipo *B. arboris* LMG 24066 que fue aislada por primera vez en el jardín público Morris Arboretum en Philadelphia en 1999. (Vanlaere y col., 2008). Adicionalmente se reporta que *B. arboris* SL1B1 tiene la capacidad productora de lipasa que tiene una estabilidad y temperatura óptima de 60°C, puede tener usos de degradación de lípidos y puede ayudar a disminuir la carga de trabajo en plantas tratadoras en fuentes de desechos de agua en restaurantes e industrias de alimentos (Matsuoka y col., 2009).

Las cepas D335 y D336 se encuentran relacionadas con *B. stabilis*, no existe información respecto a esta especie, solo se reporta como especie perteneciente al BCC.

La cepa GA10 y que ésta relacionada con GA29 y a su vez están relacionada con *B. ambifaria* fueron aisladas de rizósfera de maíz, en un estudio se ha demostrado la producción de agentes volátiles con actividad biológica aumentando la producción de biomasa en plantas de *Arabidopsis thailiana* así como la inhibición del crecimiento de dos agentes fúngicos patógenos *Rhizoctonia solani* y *Alternaria alternata*.

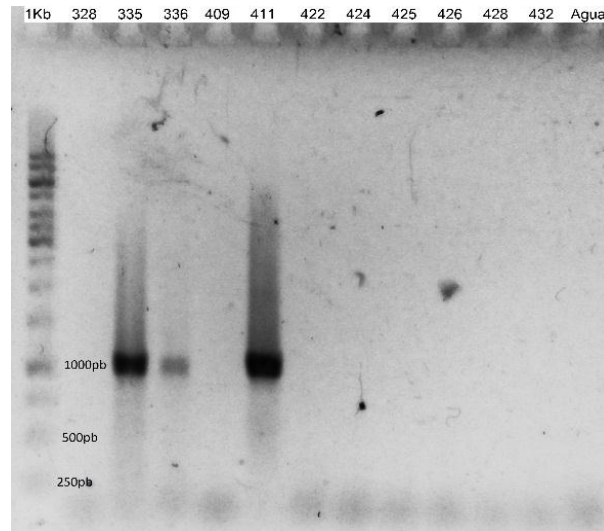


Figura 6. Productos de PCR con el uso de los oligonucleótidos BCR1 y BCR2a que nos facilitan la identificación de miembros pertenecientes al BCC con una banda esperada de 1043 pb. Se muestran miembros del grupo D

Sin embargo, éste resultado no coincidió cuando se generó el árbol a partir de secuencias del gen ribosomal 16S, siendo otras cepas que se relacionaron con BCC (Figura 7.), estas cepas fueron GA01, GA29, estas dos cepas fueron aisladas a partir de rizósfera de maíz, GB90 y GB94 aisladas de rizósfera de pino, D416 aislada de rizósfera de ajo.

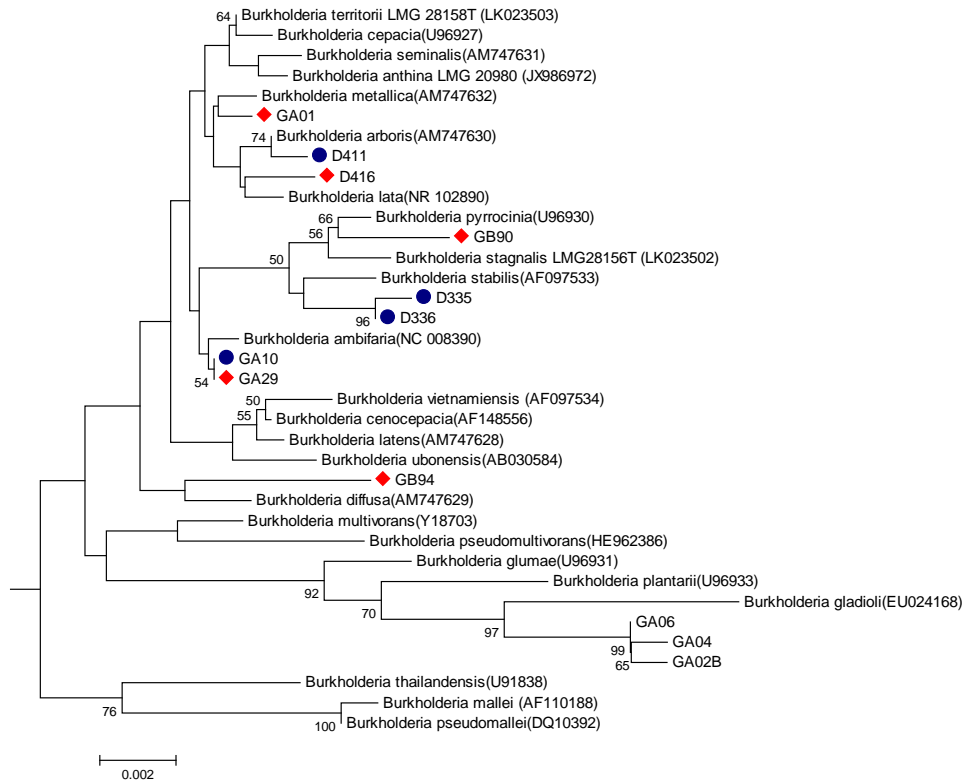


Figura 7. Clado perteneciente al complejo cepacia del género *Burkholderia*. Incluye las cepas trabajadas en este estudio, las cuales se agruparon en este conjunto de especies. En color azul las cepas identificadas por metodología PCR y en color rojo identificadas al grupo BCC después de la secuenciación.

B. metallica y la cepa GA01 se encuentran relacionadas. La cepa GA01 no fue identificada con los oligonucleótidos específicos para miembros del BCC. El primer aislamiento de esta especie se obtuvo del esputo de un paciente enfermo de fibrosis quística en 1998 en Estados Unidos de América (Vanlaere y col. 2008). La cepa GB90 al, se encuentra estrechamente relacionada con *B. pyrrocinia*, especie potencial uso biotecnológico que fue reportada recientemente. Dicha cepa podría usarse como biocontrol contra el hongo *Trichophyton* género causante de infecciones de la piel, al producir el conocido antifúngico denominado pirrolnitrina (Kwak & Shin, 2015). Así mismo, existen reportes sobre la inhibición de múltiples patógenos de plantas, en específico de la cepa *B. pyrrocinia* Lyc2, la cual fue aislada a partir de la rizósfera de tabaco, su actividad antifúngica y antibacteriana se ha demostrado *in vitro* para especies patógenas de plantas con interés agrícola (Wang y col., 2014). Adicionalmente, las cepas GA10 y GA29 parecen estar estrechamente relacionadas con *B. ambifaria* de la cual se conoce como se describió anteriormente la capacidad de inhibir el crecimiento de

algunos hongos patógenos de plantas (cacahuates, chicharos, arroz y pastisales) como *Phytium ultimum*, *Gusarium oxysporum* y *Sclerotium rolfsii* (Chiarini y col., 2006).

D. Detección de *Burkholderia* spp. utilizando los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R.

Cuando se utilizó el par de oligonucleótidos GB-F y GBN-2R que amplifican un fragmento del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA cuyo diseño se realizó sobre especies diazotróficas y especies no diazotróficas relacionadas con un porcentaje mayor o igual al 97% del género *Burkholderia*, (Perin y col., 2006) se obtuvieron 42 cepas para este ensayo con un producto de PCR con un tamaño de 1025pb, lo que representa que el 55% de las cepas probablemente desempeñen un papel en la fijación de nitrógeno (Fig. 8 y tabla 7). El artículo de referencia reporta con el uso de los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R la identificación de 111 aislados de 900 iniciales con probabilidad de fijar nitrógeno, los 111 aislamientos fueron capaces de reducir etileno y fueron positivos a la PCR con primers para la identificación del gen *nifH*. La probabilidad de que los aislamientos de este trabajo puedan tener la habilidad de llevar a cabo este mecanismo es alta y sería asequible realizar ensayos de reducción de etileno y la búsqueda del gen *nifH*. La mayoría de las cepas se ubicaron en el árbol en el clado correspondiente a cepas con potencial biotecnológico a excepción de las cepas GA2B, GA04, GA06, identificadas como *B. gladioli* en el grupo de patógenas de plantas, y las cepas GA10, D335, D336 y D411 ubicadas en el BCC con el uso respectivo de los oligonucleótidos específicos para este grupo.

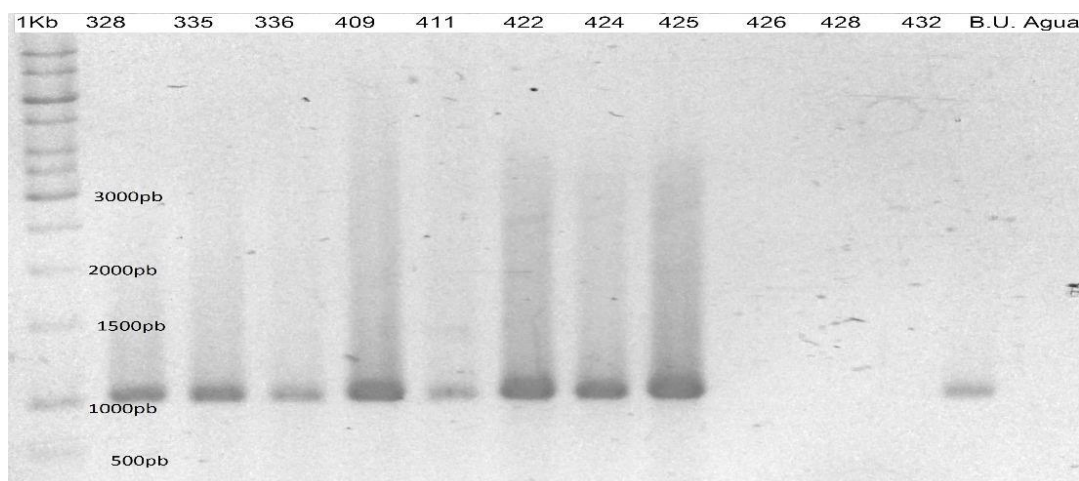
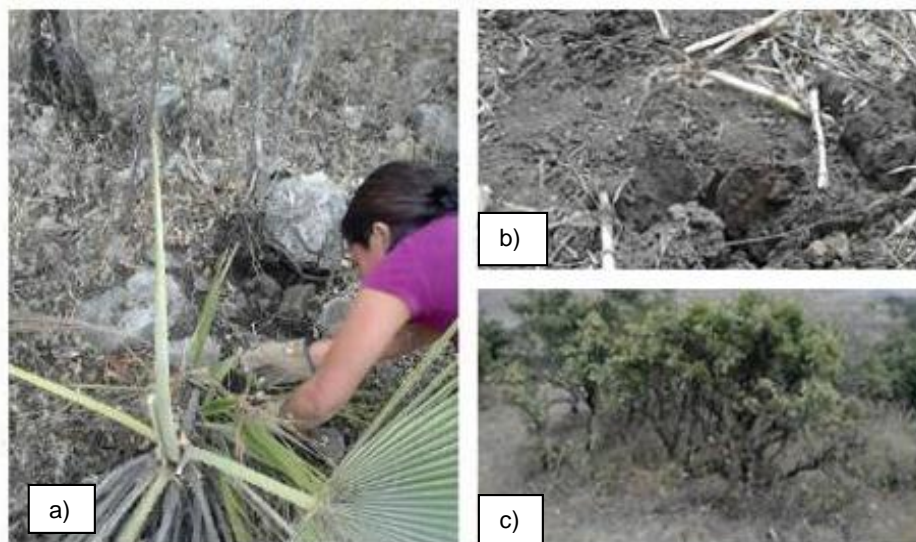


Figura 8. Productos de PCR con el uso de oligonucleótidos GB-F y GBN-2R, la banda esperada es de 1025pb. El número en cada carril corresponde a cada cepa de los aislamientos del grupo D la abreviatura BU; *B. unamae*, se utilizó como control positivo y en el último carril agua como control negativo.

Tabla 8. Cepas con probable potencial de fijación de nitrógeno

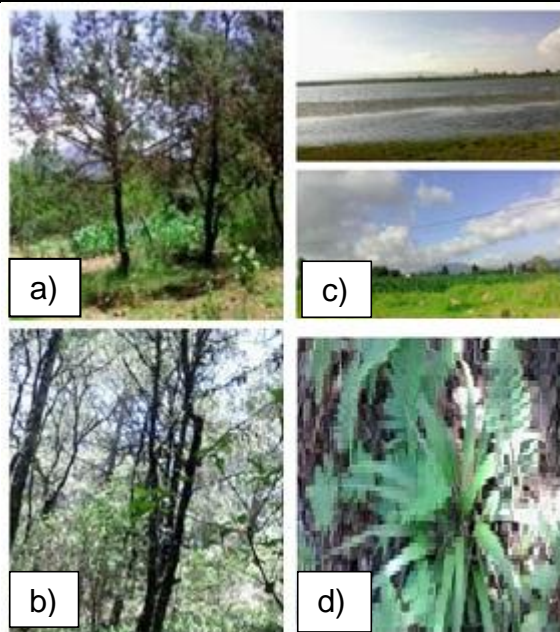
Grupo A



Se muestran imágenes de las fuentes de aislamiento de algunos especímenes solo a manera de ejemplo. a) Palma; b) Maíz; c) Leguminosa

Cepa	Sitio Geográfico	Origen
GA01	La Paz Tlaxcolpan	Rizósfera maíz (<i>Zea mays</i>)
GA2B	La Paz Tlaxcolpan	Rizósfera leguminosa (<i>Fabaceae</i>)
GA04	La Paz Tlaxcolpan	Rizósfera maíz (<i>Zea mays</i>)
GA06	La Paz Tlaxcolpan	Rizósfera maíz (<i>Zea mays</i>)
GA10	La Paz Tlaxcolpan	Rizósfera maíz (<i>Zea mays</i>)
GA29	La Paz Tlaxcolpan	Rizósfera maíz (<i>Zea mays</i>)
GA51B	San Miguel Atlapulco	Rizósfera de palma (<i>Brahea</i> sp.)

Grupo B



Se muestran imágenes de las fuentes de aislamiento de algunos especímenes solo a manera de ejemplo. a) Pino; b) Bromelias sobre un árbol; c) Un sembradío de maíz cercano a la laguna de Chignahuapan; d) Helecho.

Cepa	Sitio Geográfico	Origen
GB23	Chignahuapan	Rizósfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)
GB25	Chignahuapan	Rizósfera pino (<i>Pinus</i> sp.)
GB33	Chignahuapan	Suelo de laguna/maíz (<i>Zea mays</i>)
GB34	Chignahuapan	Suelo de laguna/ maíz (<i>Zea mays</i>)
GB42	Chignahuapan	Rizósfera de helecho
GB45	Chignahuapan	Rizósfera de helecho
GB51	Chignahuapan	Rizósfera de helecho
GB53	Chignahuapan	Rizósfera de helecho
GB62	Chignahuapan	Rizósfera de helecho
GB70	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)
GB81	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)
GB87	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)
GB91	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)
GB93	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)
GB99	Chignahuapan	Rizósfera maguey (<i>Agave</i> sp.)
GB100	Chignahuapan	Rizósfera maguey (<i>Agave</i> sp.)
GB127	Chignahuapan	Rizósfera bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)
GB130	Chignahuapan	Rizósfera bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)
GB137	Chignahuapan	Rizósfera bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)
GB148	Chignahuapan	Rizósfera bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)
GB148A	Chignahuapan	Rizósfera bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)
GB152	Chignahuapan	Rizósfera bromelia (<i>Bromelia</i> sp.)
GB169	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)
GB183	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)
GB190	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)
GB196	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)
GB197	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)
GB203	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)

Grupo D



Se muestran especies vegetales de las cuales se obtuvieron algunos aislamientos pertenecientes a este grupo. a) Café (*Coffea* sp.); b) Chile canario (*Capsicum pubescens*); c) Arándano "blueberry" (*Vaccinium corymbosum*); d) Orquídea.

Cepa	Sitio Geográfico	Origen
D328	Cuetzalan	Rizósfera Blueberry (<i>Vaccinium corymbosum</i>)
D335	Cuetzalan	Rizósfera Chile canario (<i>Capsicum pubescens</i>)
D336	Cuetzalan	Rizósfera Chile canario (<i>Capsicum pubescens</i>)
D409	Cuetzalan	Rizósfera Café (<i>Coffea</i> sp.)
D411	Cuetzalan	Rizósfera Café (<i>Coffea</i> sp.)
D422	Cuetzalan	Rizósfera Orquídea (<i>Orchidaceae</i>)
D424	Cuetzalan	Rizósfera Orquídea (<i>Orchidaceae</i>)
D425	Cuetzalan	Rizósfera Alcatraz (<i>Zantedeschia</i> sp.)

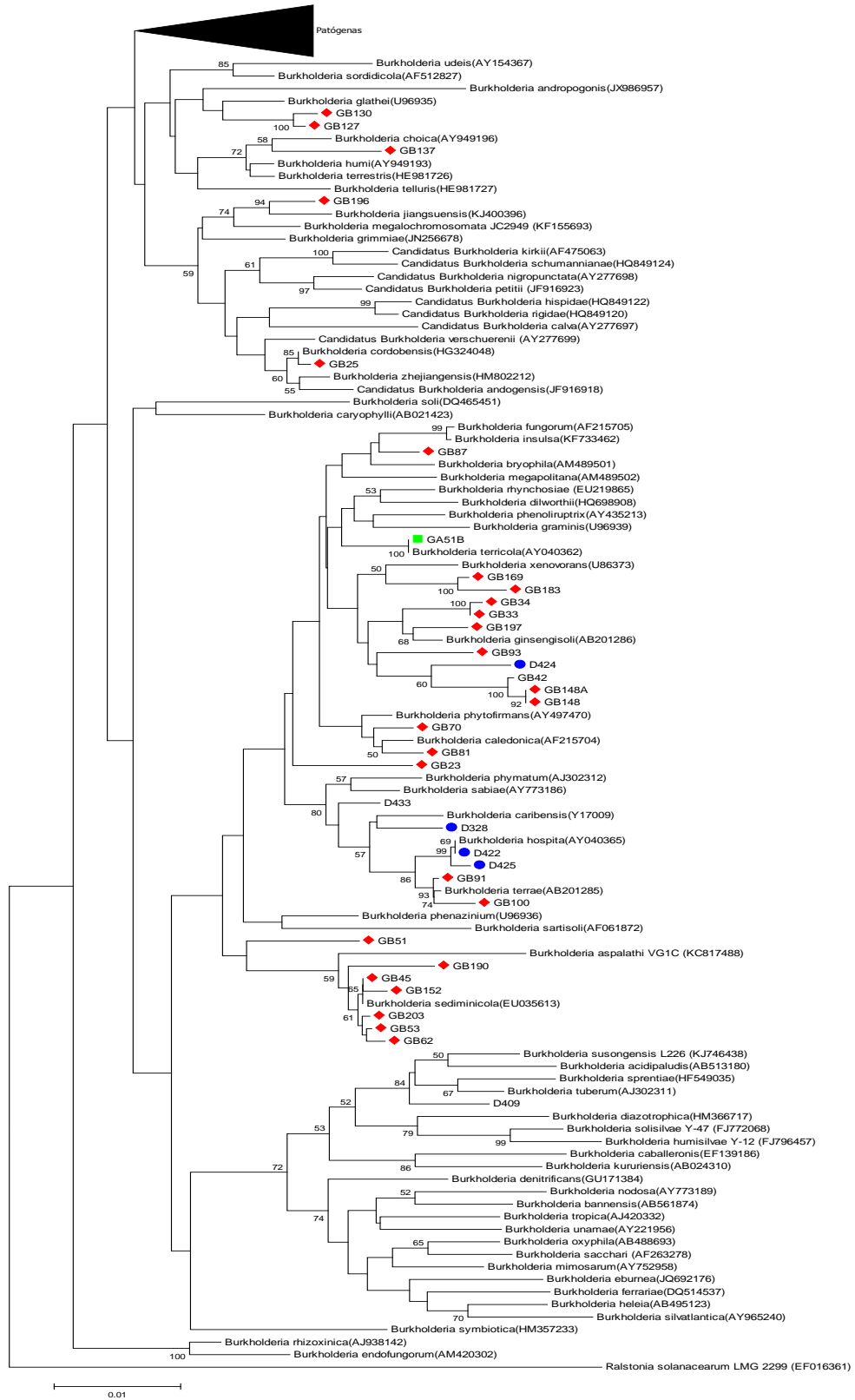


Figura 9. Árbol que destaca las cepas que dieron señal positiva al ensayo de PCR para detectar a miembros con probabilidad de fijar nitrógeno. Se muestra únicamente el clado con potencial biotecnológico. Las cepas que pertenecen al grupo A (San Miguel Atlapulco y La paz Tlaxcalpan) están señaladas con el cuadrado color verde. Las cepas que pertenecen al grupo B (Chignahuapan) están marcados con el rombo color rojo y las cepas correspondientes al grupo D están señaladas con el círculo color azul

E. Detección de especies patógenas de plantas *B. gladioli*, *B. plantarii* y *B. glumae*

Bajo la técnica de PCR múltiple, utilizando los oligonucleótidos específicos glu-FW, glu-RV, pla-FW, pla-RV, gla-FW y gla-RV (Maeda y col., 2006) se detectaron cuatro cepas con señales específicas debido a los pesos esperados de la banda a dos especies en particular, a *B. gladioli* y *B. plantarii*. Tres cepas se correlacionan con *B. gladioli* basado en el tamaño del producto de amplificación y en el árbol filogenético final quedan estrechamente relacionadas directamente con esta misma especie (Figura 11). La cepa D424 que presuntivamente pertenecía a la especie *B. plantarii* con el ensayo de PCR, después de la secuenciación se observa que se agrupa en un clado totalmente diferente quedando muy distante de las patógenas de plantas e incluyéndose en el clado de las PBE. A manera de ejemplo se muestra una imagen del gel de la estandarización de la técnica (Figura 10), y las cepas correspondientes al ensayo en la Tabla 8.

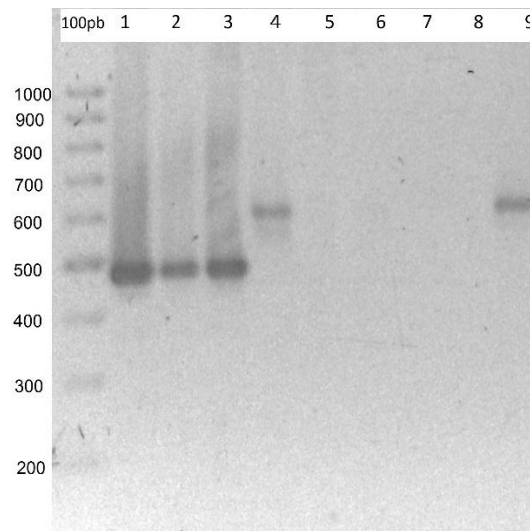


Figura 10. PCR para *Burkholderias* patógenas de plantas específicamente *B. gladioli* (479pb), *B. glumae* (527pb) y *B. plantarii* (597pb) por medio de PCR múltiple con 3 pares de primers distintos y una T_m de 63°C. *B. gladioli* LGM2216 cultivo fresco 1:10 (1); *B. gladioli* UAPS07070 cultivo fresco(1:10 (2); *B. gladioli* LGM2216 DNA total 1:10 (3); *B. plantarii* LGM9035 DNA total 1:10 (4); *B. gladioli* LGM2216 DNA total (5); *B. plantarii* DNA total (6); *B. cepacia* DNA total 1:20 (7); Agua(8); *B. plantarii* LGM9035 cultivo fresco 1:20 (9).

Tabla 8. Cepas con amplificado positivo para las especies *B. plantarii* y *B. gladioli* con el uso de los oligonucleótidos glu-FW, glu-RV, pla-FW, pla-RV, gla-FW y gla-RV.

Cepa	Sitio Geográfico	Origen	Especie presuntiva	Clima	pH	Altitud MSNM
GA2B	La Paz Tlaxcolpan	Rizósfera leguminosa)	<i>B. gladioli</i>	Seco/semiseco	7.3	2095
GA04	La Paz Tlaxcolpan	Rizósfera maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>B. gladioli</i>	Seco/semiseco	5.2	2095
GA06	La Paz Tlaxcolpan	Rizósfera maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>B. gladioli</i>	Seco/semiseco	5.2	2095
D424	Cuetzalan	Rizósfera Orquídea (<i>Orchidaceae</i>)	<i>B. plantarii</i>	Cálido húmedo	4.97	1520

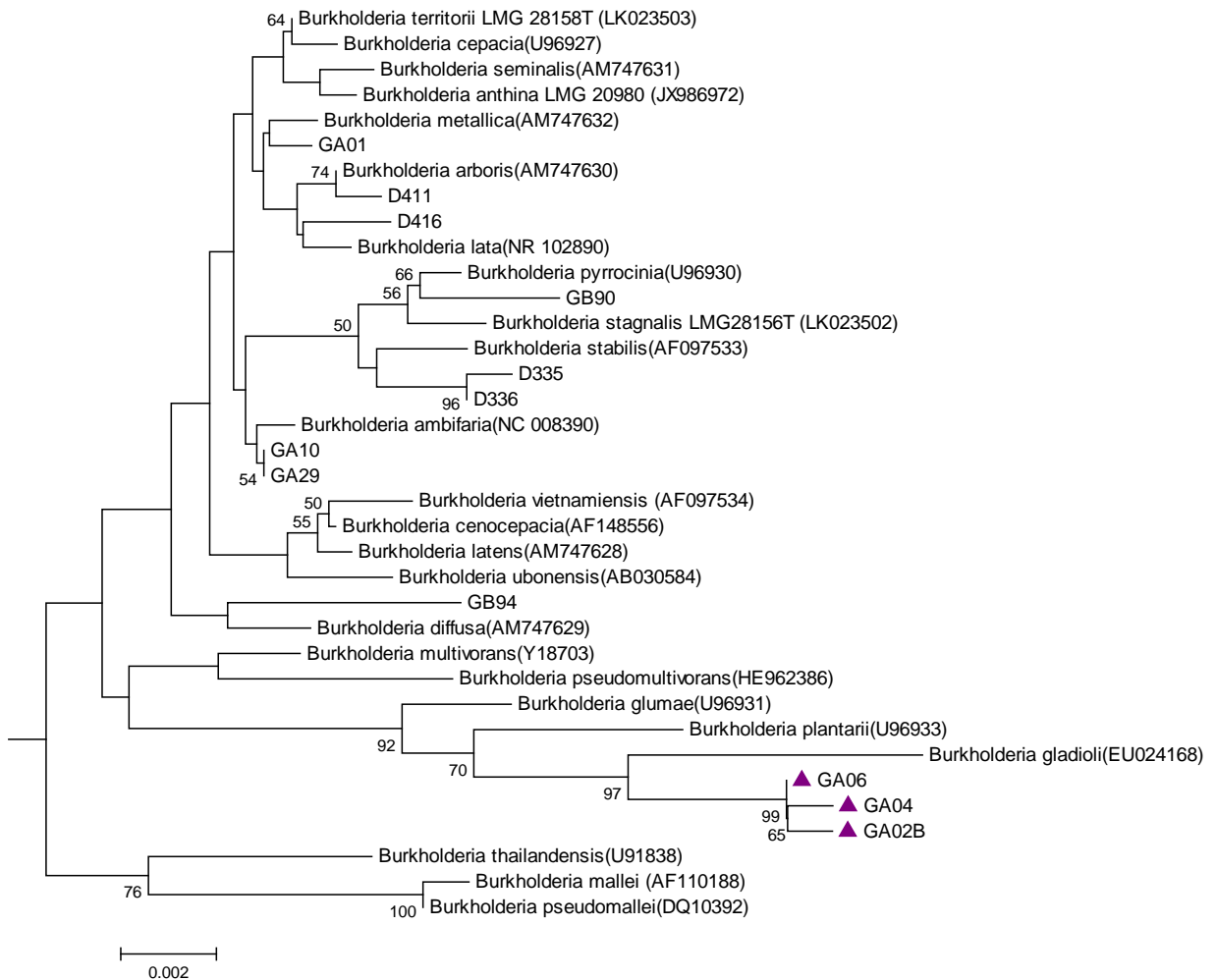


Figura11. Sección del árbol filogenético obtenido de secuencias del gen ribosomal 16S que muestran a las especies detectadas como patógenas de plantas, en este caso se trata de *B. gladioli* para las tres cepas que muestran marcadas con triángulo morado delante de cada una de ellas.

Finalmente, se obtuvo una clasificación previa de las cepas aisladas gracias al uso de los oligonucleótidos específicos quedando con un total de 77 cepas como se muestra en la siguiente Figura 12. Se detalla en porcentaje la agrupación de las cepas con probable potencial de fijar nitrógeno, pertenecientes al BCC, patógenas de plantas y las restantes de las cuales se obtuvo el amplificado con los oligonucleótidos Bf y Br con alta especificidad para el género *Burkholderia*. El uso de estos oligonucleótidos fue de ayuda significativa previa a la secuenciación y tener un panorama general del tipo de cepas en cuanto a su uso benéfico o su patogenicidad asociada a plantas así como la relación con miembros del BCC. Concluyendo en torno a estos ensayos la existencia de estos oligonucleótidos fueron de gran utilidad pues nos ayudaron a identificar de manera exitosa a las cepas como pertenecientes al género *Burkholderia* y esto finalmente corroborado con la secuenciación del gen ribosomal 16S.

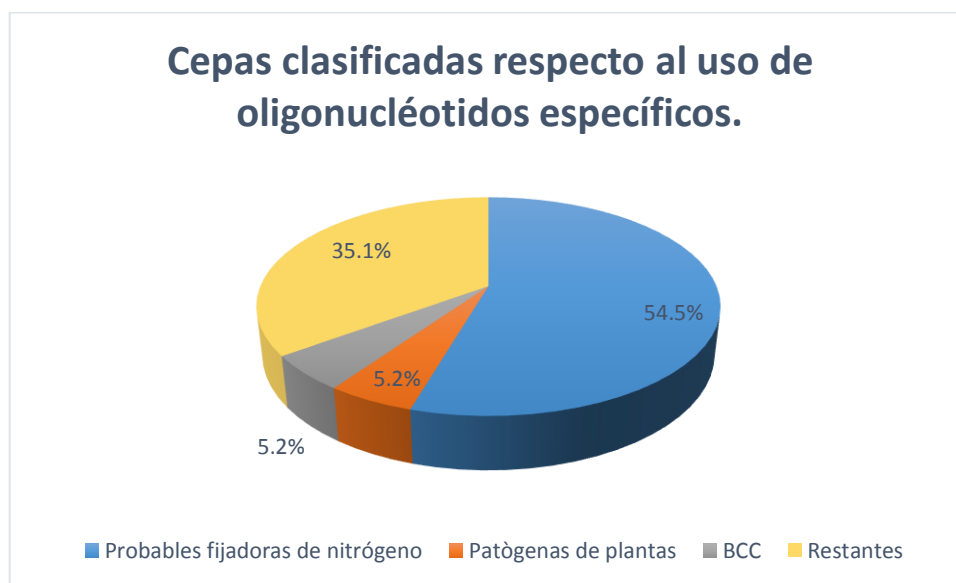


Figura 12. Gráfica que representa la clasificación obtenida a raíz del uso de oligonucleótidos específicos para *Burkholderias* del complejo cepacia (BCC) (Mahenthiralingam y col., 2000); para especies con probable potencial de fijar nitrógeno GB-F y GBN-2R (Perin y col, 2006).; glu-FW, glu-RV, pla-FW, pla-RV, gla-FW y gla-RV (Maeda y col, 2006) para la detección de especies patógenas de plantas a partir de 77 cepas.

Por otra parte se muestra en la Tabla 9 un resumen con los diferentes oligonucleótidos utilizados así como los rangos de pH de manera independiente por grupo y el numero total de cepas secuenciadas.

Tabla 9. Resumen de uso de cebadores específicos y cepas secuenciadas.

	APB	APFN	BCC	PP	Secuenciadas	CPS	Rangos pH
Grupo A	33	7	1	3	12	7	5.3, 7.3
Grupo B	50	29	0	0	38	29	4.81 - 5.77
Grupo C	0	0	0	0	0	0	-
Grupo D	10	8	3	1	11	10	4.7 - 6.25
Grupo E	3	0	0	0	3	0	5.1 – 5.7
Total	96	44	4	4	64	47	

APB: Aislamientos presuntivos de pertenecer al género *Burkholderia*.

APFN: Aislamientos con probabilidad de fijar nitrógeno.

BCC: Burkholderias pertenecientes al complejo cepacia.

PP: Patógenas de plantas.

CPS: Aislamientos confirmados por secuenciación de pertenecer al género *Burkholderia*.

F. BOX-PCR de mismas fuentes de aislamiento y diferentes situaciones geográficas.

En los aislamientos se observó que en el caso de las fuentes de aislamiento existieron aislamientos múltiples a partir de una sola fuente de aislamiento y con diferentes ubicaciones geográficas.

En el caso de cepas que se encontraron en la misma fuente de aislamiento se realizó la técnica de BOX-PCR para elucidar los polimorfismos de DNA y determinar la posibilidad de que se trate de la misma cepa a pesar de ser aislada en diferente localización geográfica. Las fuentes de origen vegetal a partir de las cuales se obtuvieron más de dos cepas fueron; maíz, helecho, pino, orquídea, bromelia, chile, café y maguey.

A continuación se vincularán las posiciones de las cepas aisladas en el árbol y los ensayos de BOX-PCR en las fuentes de aislamiento donde se encontraron dos o más cepas y se describen los reportes existentes de las cepas con las que se encuentran relacionadas en la figura 20.

Maíz

Como antecedente en maíz se han estudiado en medios de cultivo libres de células procedente de *B. cepacia* MBp1 en germinación de granos, el efecto de este medio de cultivo se observa en el incremento de biomasa, en el tamaño de los brotes y

principalmente en el sistema radicular de las plántulas tratadas con el medio de cultivo libre de células. (Hernández-Rodríguez y col., 2010). Se reportan aislamientos de *Burkholderia* spp. y que además pertenecen al BCC en maíz en Italia, se reportan 3 especies *B. cenocepacia*, *B. ambifaria* y *B. pyrrocinia* (Alisi y col., 2005)

Se muestran en el siguiente orden tanto el patrón de bandeo en gel de agarosa (1.5%) a partir de la técnica de BOX-PCR como su tabla correspondiente en las figuras 12-18 y tablas 10-17.

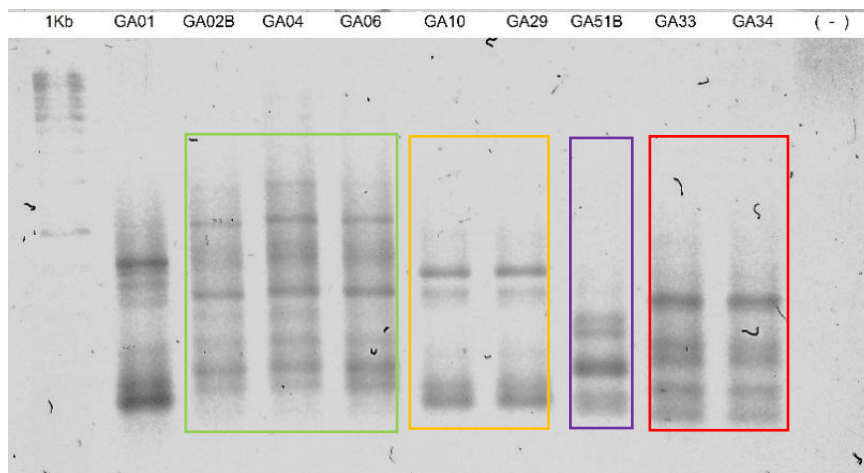


Figura 12. . BOX-PCR de cepas aisladas en rizósfera de maíz (*Zea mays*).

En la Figura 12, se observan cinco diferentes patrones de bandeo, mostrando la variedad de cepas en la muestra obtenida a partir del terreno destinado al cultivo agrícola de maíz en La Paz Taxcolpan que cuenta con un pH ácido. Existe diferencias con respecto al patrón de bandeo que muestran las cepas aisladas en las diferentes localidades. La similitud de los patrones de bandeo señalada dentro de los rectángulos es indicativo que los aislamientos pueden ser la misma cepa. En el caso de las cepas GA02B, GA04 y GA06 están identificadas molecularmente como *B. gladioli*, con el uso de oligonucleótidos específicos para la identificación de esta especie (Maeda y col., 2006), distinguiéndose la especificidad de dichos oligonucleótidos y comprobada también su identificación cuando su secuencia fue sometida a BLAST con un 99% de identidad a esta especie y se ve reflejada en el agrupamiento de estas tres cepas con la misma especie mencionada anteriormente en la Figura 20

Tabla 10. Cepas aisladas de rizósfera de maíz (*Zez mays*).

Cepa	Sitio geográfico	Clima	pH	Altura
GA01	La Paz Taxcolpan	Seco/semiseco	5.2	2095
GA2B	La Paz Taxcolpan	Seco/semiseco	5.3	2095
GA06	La Paz Taxcolpan	Seco/semiseco	5.2	2095
GA10	La Paz Taxcolpan	Seco/semiseco	5.2	2095
GA29	La Paz Taxcolpan	Seco/semiseco	5.2	2095
GA51B	San Miguel Atlapulco	Seco/semiseco	7.3	1660
GB33	Chignahuapan	Templado subhúmedo	6.05	2290
GB34	Chignahuapan	Templado subhúmedo	6.05	2290

Helecho

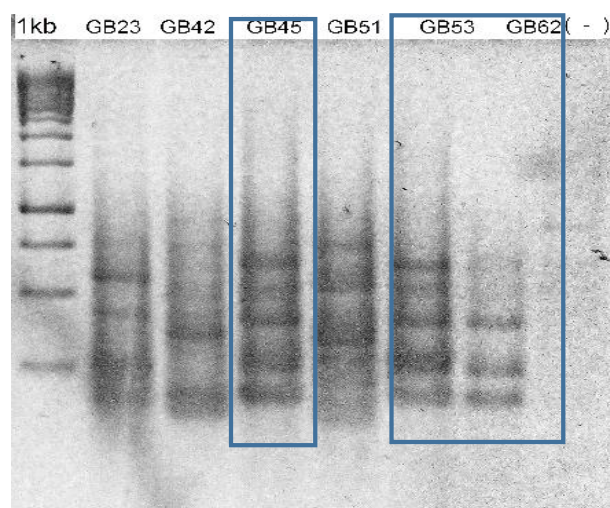


Figura 13. BOX-PCR de cepas aisladas en rizósfera de helecho (*Filicopsida*)

En la Figura 13 se observan patrones de bandeo diferentes, la variedad según estos patrones es heterogénea en su totalidad para el caso de los aislamientos provenientes de rizósfera de helecho todos de originarios de Chignahuapan, aunque en el grupo A existían aislamientos, no fueron identificados como *Burkholderia*. Los valores de pH observados, 5.51 en cinco cepas y solo en una cepa con un pH 4.81, (Tabla 10). Por otro lado, se observa una serie de patrones similares, en las cepas GB45, GB53 y GB62, los cuales se observan agrupados dentro del mismo grupo filogenético en la figura 20 relacionadas además junto con las cepas GB190, GB152 y GB203 que a su vez se relacionan con *B. sediminicola*, esta especie fue aislada en sedimento de agua (Lim y col., 2008). La cepa GB23 podría ser una nueva especie debido a su posición en el árbol filogenético en la figura 20

El resto de las cepas se agrupó en el clado de las especies PBE, se observa además que probablemente puedan fijar nitrógeno debido a la obtención de la banda esperada con los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R (Perin y col, 2006) restaría desarrollar técnicas específicas para evidenciar este potencial.

Tabla 11. Cepas aisladas de rizósfera de helecho (*Filicopsida*)

Cepa	Sitio geográfico	Clima	pH	Altura
GB23	Chignahuapan	Templado subhúmedo	4.81	2290
GB42	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.51	2290
GB45	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.51	2290
GB51	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.51	2290
GB53	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.51	2290
GB62	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.51	2290

Pino

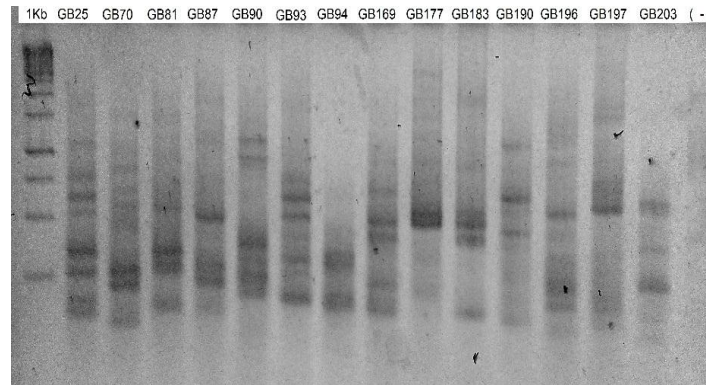


Figura 14. BOX-PCR de cepas aisladas en rizósfera de pino (*Pinus* sp.), para éste caso en particular todas las cepas corresponden a aislamientos del grupo B.

Se observan los aislamientos obtenidos a partir de rizósfera de pino (fig. 14). Es notable que ninguno de los 14 patrones de bandeo se repiten indicándonos que existe una gran variedad de colonización por parte de Burkholderias en pino. La totalidad de las cepas fueron aisladas de muestras provenientes de Chignahuapan, la mayoría de las muestras fueron identificadas como probables potenciales fijadoras de nitrógeno con el uso de los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R (Perin y col, 2006) a excepción de las cepas GB90 y GB94 que se relacionaron además en el de las BCC. El valor de pH es muy cercano con dos únicos valores 5.21 y 5.18 teniendo un total de muestras de siete para cada uno de los valores de pH (Tabla 11). Por otro lado, en la figura 20 se observa la relación filogenética de las cepas GB70 y GB81 con *B. phytofirmans*. En la literatura, está reportada la cepa *B. phytofirmans* PsJN, la cual es capaz de incrementar tanto el tamaño de los brotes como el crecimiento de raíces en papas (Kurepin y col., 2015). Esta misma cepa es utilizada experimentalmente incrementando en 50% la producción de biomasa en ensayos *in vitro* de *Panicum virgatum* conocido como pasto varilla, conocido y clasificado como un buen candidato para la producción de bioenergéticos (Kim y col., 2012) como etanol, butanol, la combustión directa, y producción sintética de gases (McLaughlin & Kszos, 2005). Cabe destacar que la cepa *B. phytofirmans* PsJN, fue aislada en 1991 de un sembradío de cebollas contaminado con el hongo micorrízico *Glomus vesiculiferum* tiene como hospederos a diversas especies vegetales tales como: *Allium cepa*, *Solanum* spp. y *Oryza sativa*, además de que también ha sido demostrada su actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* que infecta plantas productoras de uva

ocasionando la pudrición de la fruta, por otro lado, esta cepa ayuda al incremento del tamaño de estas mismas plantas a bajas temperaturas (Suárez-Moreno y col., 2012).

En el caso de la cepa GB90, ubicada filogenéticamente con base al gen 16S rDNA en el BCC se relacionó estrechamente con a *B. pyrrocinia*. Existen reportes sobre la co-inoculación esta cepa con *Methylobacterium oryzae* CBMB20 y *B. pyrrocinia* CBPB-HOD, produciendo un incremento en la absorción de nutrientes en plantas de tomate, pimienta roja y arroz. Además, se observa un incremento en los niveles de las enzimas ureasa, nitrogenasa, y fosfatasa en suelo.

Así mismo, ha sido reportado la actividad antifúngica (Biocontrol) de *B. pyrrocinia*, en específico la cepa JK-SH007 es capaz de inhibir el crecimiento de tres hongos patógenos (*Cytospora chrysosperma*, *Phomopsis macrospora* y *Fusicoccum aesculi*) de los árboles comunmente conocidos como álamos que pertenecen al género *Populus*. esta enfermedad denominada “poplar canker” afecta los tallos de éstos árboles teniendo un impacto significativo debido al uso que tienen estos árboles en la producción de fibras, producción de energía y estabilización del suelo. Esta cepa evidenció su potencial en la supresión de los tres agentes fúngicos causantes de la “poplar canker” aunado a la capacidad de promover el crecimiento de estas plantas (Ren y col., 2011).

La cepa GbB25 se encuentra relacionada con *B. cordobensis*, la cepa tipo *B. cordobensis* LMG 27620 fue aislada a partir de suelo de uso en agricultura en la provincia de Córdoba en Argentina. Esta cepa contiene un cluster de genes relacionados con la quimiotaxis hacia compuestos cloronitroaromáticos además de la degradación de estos compuestos y se han encontrado un par de cepas mas que comparten este cluster de genes; *B. cordobensis* Y123 y *Burkholderia* sp. SJ98 (Pandey y col., 2012; Kumar y col., 2013).

Tabla 12. Cepas aisladas de rizósfera de pino (*Pinus* sp.).

Cepa	Sitio geográfico	Clima	pH	Altura
GB25	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.21	2290
GB70	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.18	2290
GB81	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.18	2290
GB87	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.18	2290
GB90	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.18	2290
GB93	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.18	2290
GB94	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.18	2290
GB169	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.21	2290
GB183	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.21	2290
GB190	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.21	2290
GB196	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.21	2290
GB197	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.21	2290
GB203	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.21	2290

Orquídeas

Como antecedentes de aislamientos de *Burkholderia* spp. en orquídeas se tiene conocimiento de *B. andropogonis* que se encuentra afectando a diversas especies de estas plantas causando un punteado color negro u oscuro sobre las hojas. (Takahashi y col., 2004). Se ha reportado el aislamiento de *B. gladioli* en Hawaii en orquídeas causando un punteado que va de los colores verde-oscuro a café. (Keith y col., 2005)

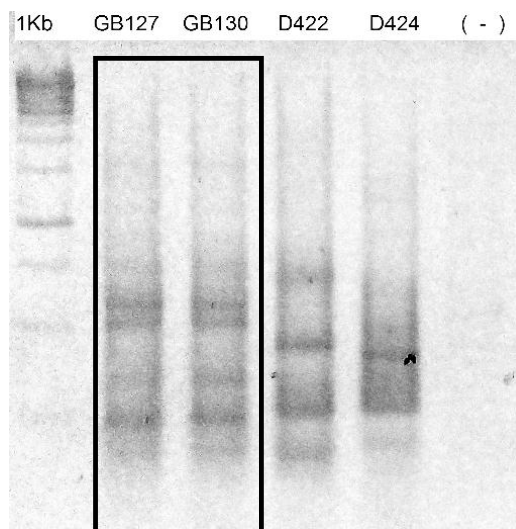


Figura 15. BOX-PCR de cepas aisladas en rizósfera de orquídea (*Orchidaceae*) Se observan dos patrones iguales y están encerrados en el rectángulo negro

Se muestran en la Figura 15 los cuatro aislamientos obtenidos a partir de rizósfera de orquídeas, se tienen dos patrones similares lo que presuntivamente podría tratarse de la misma cepa, estos aislamientos provienen de Chignahuapan y corresponden a las cepas GB127 y GB130. Los dos patrones restantes son originarios de muestras de rizósfera de orquídeas resultantes de Cuetzalan. Las cuatro cepas cuentan con la posibilidad de poder fijar nitrógeno, resultado del uso de los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R (Perin y col., 2006). En la ubicación del árbol se observa relación de estas cepas con las especies PBE y en relación con *B. glathei*

Tabla13. Cepas aisladas de rizósfera de orquídea (*Orchidaceae*).

Cepa	Sitio geográfico	Clima	pH	Altura
GB127	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.77	2290
GB130	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.77	2290
D422	Cuetzálan	Cálido húmedo	4.97	1520
D424	Cuetzálan	Cálido húmedo	4.97	1520

Bromelias

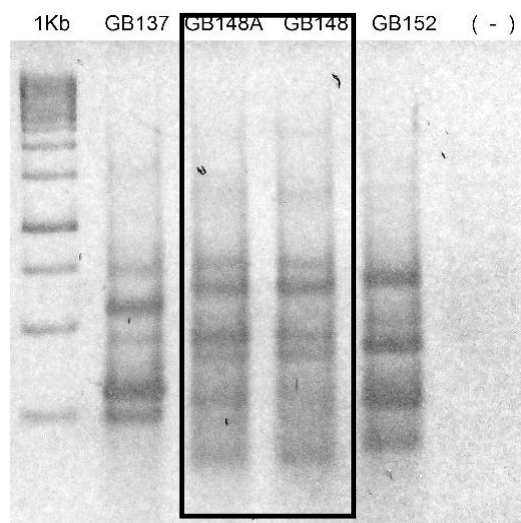


Figura 16. BOX-PCR de cepas aisladas en rizósfera de bromelia (*Bromelia* sp.).

Los patrones de bandeo de las cuatro muestras aisladas a partir de rizósfera de bromelias se muestran en la Figura 16, y dichos aislamientos son procedentes de Chignahuapan. Se obtuvieron en total tres genotipos. En el caso de las cepas GB148 y GB148A se observa el mismo patrón de bandeo, esto es indicativo de ser la misma cepa, esto puede ser confirmado en la Figura 20, estas cepas se ubican en un grupo monofilético comprendido por cepas aisladas en este estudio y están comprendidas por

las cepas GB33, GB34 aisladas de rizósfera de maíz y pH de 6.05, GB42 aislada de rizósfera de helecho y pH de 5.51, GB197 aislada de rizósfera de pino y pH de 5.21 y D424 aislada de rizósfera de orquídea y pH de 4.97, las cuales están relacionadas con *B. ginsengisoli* esta especie fue reportada por primera vez en Korea del Sur en 2005 por An y col. y fue aislada del suelo cercano a un campo de siembra de ginseng y por este motivo es que recibe su nombre (Kim y col., 2006). La cepa GB152 está relacionada con la especie *B. sediminicola* y con esta especie hay otras cepas relacionadas que ya se mencionaron en la sección de BOX-PCR en helecho, además la cepa GB137 se relaciona con *B. choica* la cepa tipo LMG22940 fue aislada en Holanda en suelo rizosférico de pastizales temporales en 2003 (Vandamme y col., 2013). Las cuatro cepas quedan agrupadas en el clado de especies PBE. Además cuentan con la el probable potencial de fijar nitrógeno, resultado del uso de los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R (Perin y col., 2006), se tienen que hacer ensayos específicos para asegurar este potencial.

Tabla 14. Cepas aisladas de rizósfera de bromelia (*Bromelia* sp.).

Cepa	Sitio geográfico	Clima	pH	Altura
GB137	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.77	2290
GB148	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.77	2290
GB148A	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.77	2290
GB152	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.77	2290

Chile

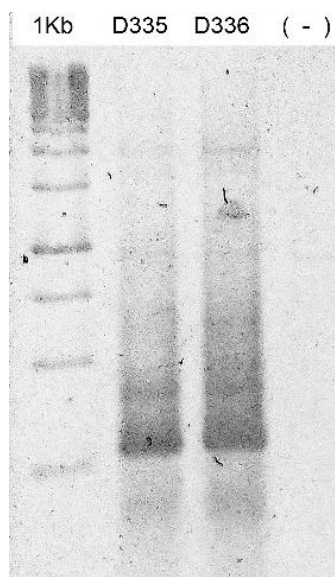


Figura 17. BOX-PCR de cepas aisladas de rizósfera de chile canario (*Capsicum pubescens*).

La Figura 17 muestra los patrones de bandeo de las dos muestras aisladas a partir de rizósfera de chile canario, ambas muestras son originarias de la región de Cuetzalan. Se observó el mismo patrón de bandeo, y al correlacionarlo con el árbol filogenético, se corroboró que es misma cepa (Figura 20). No existen reportes de aislamientos de Burkholderias en especies de chile en México.

La relación de estas cepas en la Figura 20 es con *Burkholderia*. La fuente de aislamiento de esta cepa fue de pacientes con fibrosis quística de muestras de esputo, pacientes que no padecen fibrosis quística en muestras de sangre, oído y tracto respiratorio, además de muestras ambientales hospitalarias. El primer aislamiento de la cepa tipo *B. stabilis* LGM 14294 fue realizado del esputo de un paciente con fibrosis quística en Bélgica en 1993 (Vandamme y col., 2000). Las dos cepas quedan agrupadas en el clado de especies patógenas en el BCC. Además cuentan con la posibilidad de poder fijar nitrógeno, resultado del uso de los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R (Perin y col., 2006) se tienen que hacer estudios específicos para evaluar esta capacidad.

Cuadro 15. Cepas aisladas de rizósfera de chile canario (*Capsicum pubescens*).

Cepa	Sitio geográfico	Clima	pH	Altura
D335	Cuetzálan	Cálido húmedo	5.54	1619
D336	Cuetzálan	Cálido húmedo	5.54	1619

CAFÉ

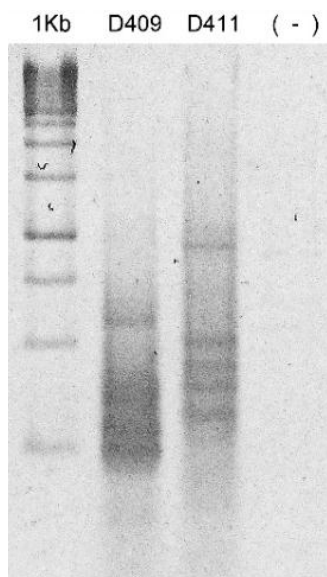


Figura 18. BOX-PCR de cepas aisladas en rizósfera de café Café (*Coffea* sp.).

A partir de rizósfera de café, dos aislamientos bajo la técnica de BOX-PCR presentaron patrones de bandeo diferentes, ambas muestras son originarias de la región de Cuetzalan (Figura 18). El patrón de bandeo distinto indica que son cepas diferentes, lo cual se confirma en la Figura 20.

La cepa D411 está agrupada con las especies pertenecientes al PBE y tiene relación con *B. arboris*, el aislamiento de esta especie se ha realizado en muestras clínicas de pacientes con fibrosis quística y muestras ambientales como en el caso de la cepa tipo *B. arboris* LMG 24066 (Vanlaere y col., 2008). Por otra parte *B. arboris* SL1B1 tiene la capacidad productora de lipasa que tiene una estabilidad y temperatura óptima de 60°C, puede tener usos de degradación de lípidos y puede ayudar a disminuir la carga de trabajo en plantas tratadoras en fuentes de desechos de agua en restaurantes e industrias de alimentos (Matsuoka y col., 2009), además fue aislada de bambú (*Phyllostachys edulis*) en un estudio sobre diversidad de especies del BCC en plantas de bambú en China (Lou y col., 2011). La cepa D409 se agrupa en el clado de especies PBE relacionándose con las especies *B. susongensis*, *B. acidipaludis*, *B. spreintiae* y *B. tuberum*. La especie *B. susongensis* fue aislada de la superficie erosionada de la roca micacita en susong en China la cepa tipo es la JCM30231. (Gu y col., 2015). La cepa tipo *B. acidipaludis* SA33 fue aislada en la planta acuática *Eleocharis dulcis* originaria de

Vietnam y de la cual sus bulbos son comestibles, cabe destacar que esta planta crece de forma exuberante en un pantano con un pH de 3 (Aizawa y col., 2010). La cepa tipo de *B. sprentiae* LMG 27175 fue aislada de los nódulos de raíces de la leguminosa *Lebeckia ambigua* perene en el cabo occidental de Sudáfrica en 2007, esta especie es capaz de fijar nitrógeno en la planta *L. ambigua* y *L. sepiaria* (De Meyer y col., 2013). Por último la cepa *B. tuberum* LMG 21444 fue aislada de nódulos de raíces de la leguminosa tropical *Aspalatus carnosus* originaria de Sudáfrica (Vandamme y col., 2002). Las cepas D409 y D411 son probables fijadoras de nitrógeno resultado del uso de los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R (Perin y col., 2006), se tendrían que realizar pruebas específicas para comprobar este potencial.

Se han reportado aislamientos de especies *Bukholderia unamae* (Perin y col., 2006), *B. kururiensis* y *B. vietnamiensis* (Estrada-de-los-Santos y col., 2001) en plantas de café. La tabla 15 muestra los datos correspondientes de este grupo de aislamientos.

Tabla 16. Cepas aisladas de rizósfera de café (*Coffea* sp.).

Cepa	Sitio geográfico	Clima	pH	Altura
D409	Cuetzálan	Cálido húmedo	4.7	1597
D411	Cuetzálan	Cálido húmedo	4.7	1597

MAGUEY

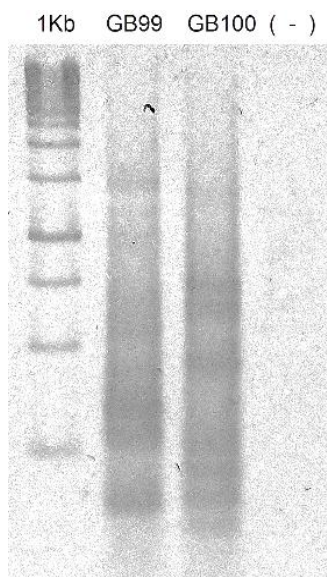


Figura 19. BOX-PCR de cepas aisladas de rizósfera de maguey.

Las dos muestras aisladas a partir de rizósfera de maguey originarias de la región de Chignahuapan, muestran diferentes patrones de bandeo (Figura 19), lo que indica que son cepas distintas y se confirma en la Figura 20 la cepa GB100 se relaciona con *Burkholderia terrae*, la cepa tipo *B. terrae* KCTC 12388 fue aislada del suelo de bosque cubierto de hojas en Daejeon en Korea del Sur (Yang y col., 2006). La cepa GB99 podría ser una especie nueva, queda agrupada en el clado de las especies PBE. La Tabla 16 muestra los datos correspondientes de este grupo de aislamientos Las dos cepas son probables fijadoras de nitrógeno resultado del uso de los oligonucleótidos GB-F y GBN-2R (Perin y col., 2006) y se ubican en el clado de especies PBE. Existe un reporte en México de aislamiento de *Burkholderia* spp. en maguey por Vacaseydel Aceves, 2012

Tabla 17. Cepas aisladas de rizósfera maguey (*Agave* sp.).

Cepa	Sitio geográfico	Clima	pH	Altura
GB99	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.88	2290
GB100	Chignahuapan	Templado subhúmedo	5.88	2290

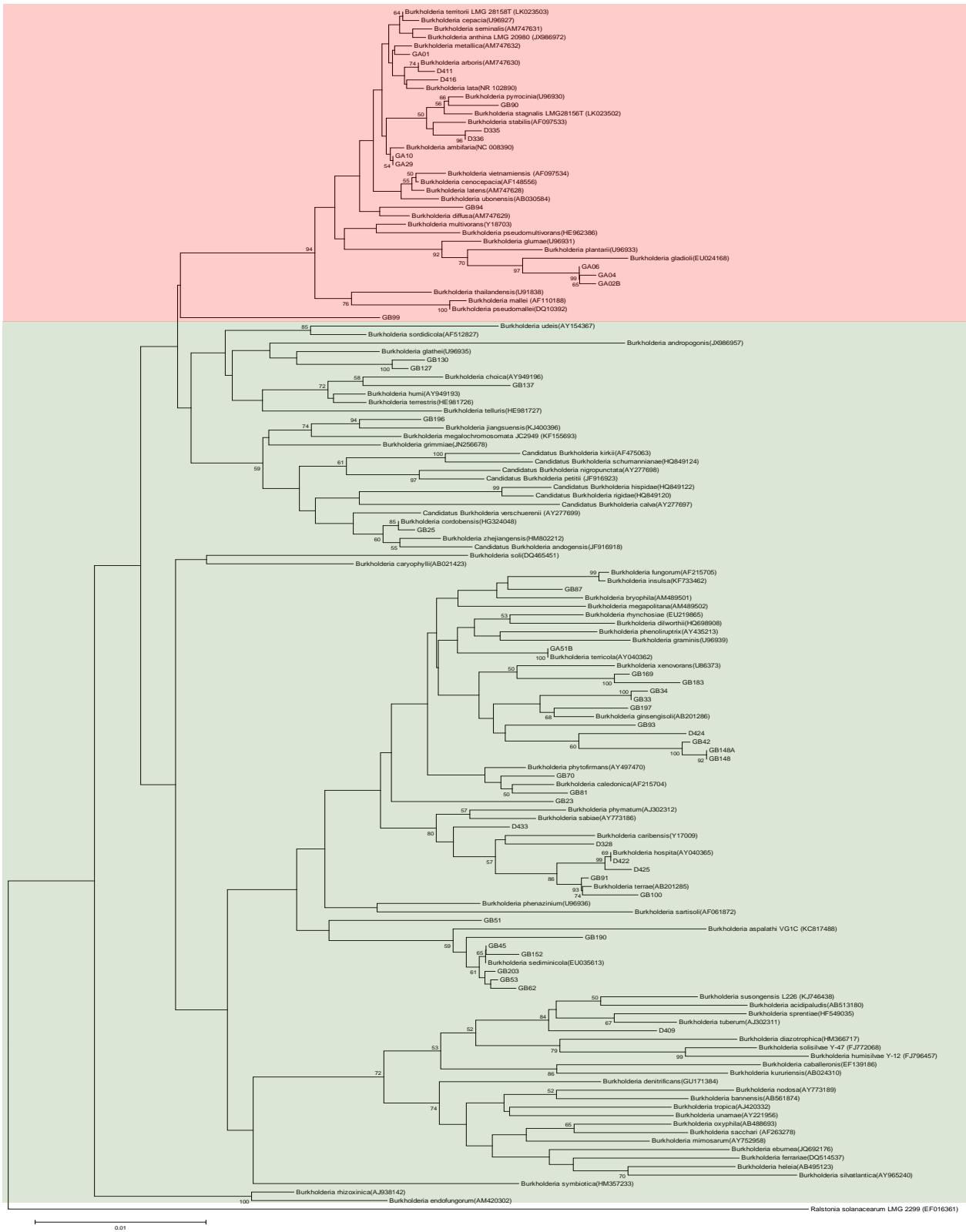


Figura 20. Árbol filogenético obtenido por el método de Neighbor Joining con el modelo de sustitución Jukes-Cantor y Bootstrap de 1000 repeticiones para secuencias parciales del gen ribosomal 16S del género *Burkholderia*. Enraizado con *Ralstonia eutropha* H16. El número en cada rama es el valor de bootstrap. En verde el clado de *Burkholderia* asociadas a plantas, benéficas y ambientales (PBE), en color rojo el clado que incluye a especies patógenas.

Existen otras relaciones que no se han mencionado en este escrito como la cepa GB196 que se relaciona con *B. jiangsuensis* y se tiene el reporte de una cepa de esta especie que es capaz de degradar al pesticida llamado metil-paration en una zona de desechos donde formalmente se fabricaba este producto en la provincia de Jiangsu en China, la cepa GB196 está ubicada en el clado de las especies PBE y se puede observar en la Figura 20 (Liu y col., 2014).

La cepa GA51B se encuentra relacionada con *B. terricola*, la cepa tipo *B. terricola* LMG 20594 fue aislada en suelo de uso en agricultura en Pittem, Belgica a una profundidad de 30 a 60 cm (Goris, y otros, 2002).

La cepa GB81 esta relacionada con *B. caledonica*, la cepa tipo *B. caledonica* LMG 19076 fue aislada en Edimburgo, Inglaterra a partir de suelo rizosférico (Coenye y col., 2001)

La cepa GB87 que se encuentra relacionada con las, *B. insulsa* y *B. fungorum*, y en el clado de las especies PBE. Existe un reporte, en el que describe que la cepa *B. fungorum* JC3 fue aislada en un sembradío de arroz que por muchos años fue utilizado como tiradero de materiales electrónicos para su reciclaje y está contaminado con metales pesados. La cepa *B. fungorum* JC3 demostró que tiene capacidad para secuestrar cadmio, direccionando más investigaciones para que pueda ser utilizada en la recuperación de cadmio significando la biorremediación de suelos contaminados con este metal (Jun-hui y Hang, 2010).

En otro estudio, la cepa *B. fungorum* FLU100 fue estudiada debido a su capacidad de degradar fluorobenceno, un compuesto aromático con usos en la industria, como pesticida, solvente o incluso como precursor de algunos fármacos (Strunk y Engesser , 2013).

Otro ejemplo es la cepa *B. fungorum* UFLA 04-155, la cual promueve el crecimiento de plantas de frijól, incrementando el peso seco de brotes y nodulos, así como, el contenido foliar de los elementos P, Mg, Cu, Fe, K, Ca, S, y Zn y además, estimuló la nodulación de la comunidad nativa de rizobias (Oliveira-Longatti y col., 2015).

Las cepas GB169, y GB183 estan relacionadas con *Burkholderia xenovorans*, y la cepa LB400 como ya se mencionó anteriormente es considerada como una de las más

importantes degradadoras de bifenilos policlorados (PCB) degradando más de 20 compuestos relacionados a los PCB y que fue aislada de suelo contaminado con policlorobifenil en New York por un grupo de investigación de General Electric, hasta el momento no existen evidencias de haber sido aislada esta especie en pino (Bedard y col., 1986).

La diversidad de *Burkholderia* spp. se ve reflejada directamente en el árbol filogenético que se muestra en la Figura 20 donde el agrupamiento de nuestras cepas es concordante con las secuencias de cepas tipo del gen ribosomal 16S, lo esperado en torno a los aislamientos era la identificación de cepas que pertenecieran al género *Burkholderia* y los resultados fueron positivos pues finalmente se obtuvieron 47 cepas ya identificadas como *Burkholderia* spp. Se necesitan procesos de taxonomía polifásica en el que se evalúen algunas pruebas metabólicas así como el contenido de ácidos grasos en suma con el análisis bioinformático de genes de mantenimiento para mejorar la resolución filogenética y llegar a nivel de especie.

Este trabajo tiene ventajas sobre el número de cepas aisladas en comparación con un trabajo similar generado en el estado de Tamaulipas por Vacaseydel-Aceves en 2012 donde se inició con un aproximado de 1500 muestras presuntivas de pertenecer al género y de las cuales solo 5 cepas fueron confirmadas como *Burkholderia* spp. Además los aislamientos procedían de fuentes como el maíz y maguey y se identificaron a estas 5 especies como *B. gladioli* y miembros del BCC.

La variedad de cepas obtenida en este estudio es sustancial, la mayor variedad se encontró en las muestras rizosféricas de pino con un total de 14 cepas distintas con clima templado subhúmedo y pH de 5.18 - 5.21, segundo lugar las muestras de rizósfera de maíz con 5 cepas diferentes y fueron aisladas en los climas seco-semiseco, templado subhúmedo con valores de pH de 5.2 – 7.3, y en tercer lugar con 4 cepas distintas las muestras rizosféricas de helecho, estas muestras provienen de clima templado subhúmedo con valores de pH de 4.81 – 5.51.

El pH de la fuente de aislamiento se observó que tuvo una variación muy amplia que va desde 4.7 hasta 7.3. Los valores de pH con el mayor número de aislamientos en el rango de 5.1-5.5 con un total de 27 aislamientos, seguido por el rango de pH 6.1-6.5 con un

total de 12 cepas aisladas y teniendo el rango con menor número de aislamientos se tienen los valores de pH que van de 6.1-6.5 (Figura 21.) Caballero-Mellado y col. En 2004 obtuvieron aislamientos de *B. unamae* en suelos cuyo pH oscilaba entre 4.5 y 7.1 Se demostró que el género *Burkholderia* tiene una amplia tolerancia a ambientes con valores de pH ácidos teniendo ventajas de crecimiento en suelos con características ácidas y no en suelos con valores de pH alcalinos.

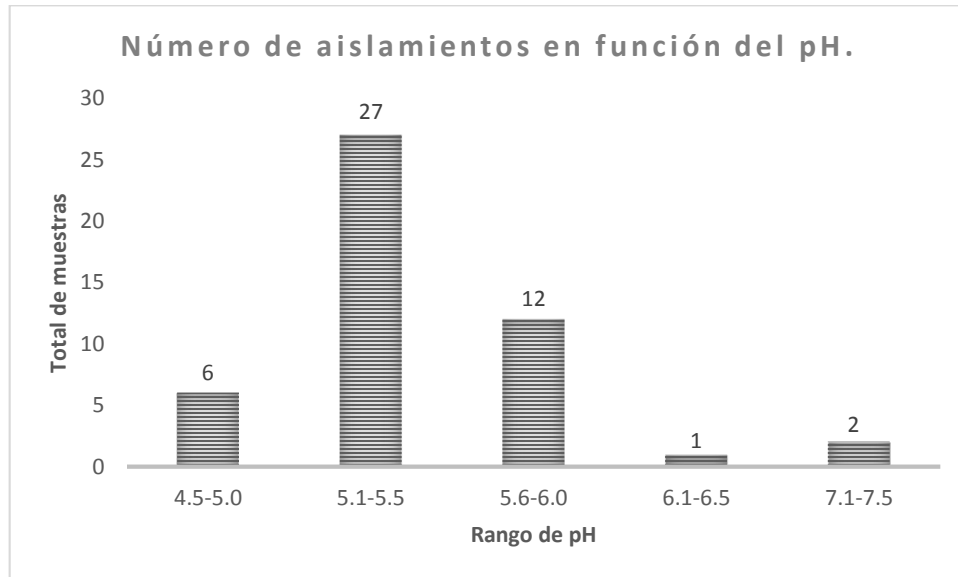


Figura 21. Gráfico que representa el número total de aislamientos respecto al pH.

Finalmente el resultado de obtención del cepario de *Burkholderia* spp. fue en su totalidad de rizósfera de diversas especies de plantas, aunque se tomaron muestras de dos cuerpos de agua y se han reportado especies como *B. sediminicola* (Lim y col., 2008), en este estudio no se obtuvieron cepas que pertenecieran a éste género.

La región del Pico de Orizaba tiene un clima frío y dado que *Burkholderia* spp. es mesófila puede estar relacionado con la nulidad de aislamientos. Por otra parte la baja humedad en la región de la biosfera Tehuacán-Cuicatlán podría ser un factor para que no se hayan encontrado aislamientos de *Burkholderia* spp.

G. Diversidad genética calculada con base a la diversidad nucleotídica (π).

Con los alineamientos previamente obtenidos con el programa MEGA 6.0 (Tamura, y col., 2013) y la herramienta DNAsp (Librado & Rozas, 2009) se calculó del polimorfismo del DNA " π " (Nei, 1987) se obtuvieron que para el grupo A $\pi= 0.02205 \pm 0.00696$, para el grupo B $\pi=0.03031 \pm 0.00197$, para el grupo D $\pi=0.03098 \pm 0.00301$ y los tres grupos evaluados en conjunto $\pi=0.03287 \pm 0.00110$ y se encuentran resumidos en la tabla 18.

Tabla 18. Diversidad nucleotídica calculada por grupo, se muestran además los valores de π del grupo A vs grupo B, grupo A vs grupo D y grupo B vs grupo D así como el valor de π que comprende un total de 47 secuencias.

	Grupo A	Grupo B	Grupo D	π	Patógenas	No patógenas
Grupo A		0.03308	0.03019	0.02205 \pm 0.00696	12.7%	2.1%
Grupo B			0.03143	0.03031 \pm 0.00197	6.3%	59.5%
Grupo D				0.03098 \pm 0.00301	8.5%	10.6%
General				0.03287 \pm 0.00110	27.5%	72.1%

La mayor diversidad de entre los grupos corresponde al grupo D y el grupo con la menor diversidad es el grupo A, en un análisis más generado por la identidad de las secuencias obtenidas en este estudio se observó que se tiene una identidad del 93.3% \pm 3.7 entre las muestras, así mismo se tienen secuencias con la mayor identidad con un valor del 99.9% y por otra parte las secuencias con el menor valor de identidad tienen un valor del 89.24%.

Se puede por los valores cercanos a cero y aunado a la barra de distancia que aparece en la figura 20 barra es representación de la sustitución nucleotídica por unidad de distancia y con respecto al tamaño de las ramas se puede concluir que la diversidad genética para el locus evaluado es muy baja. Se distingue así la relación estrecha de este género evaluando únicamente para el locus 16S rRNA y se hace evidente la necesidad de pruebas de taxonomía polifásica para poder tener una mayor resolución filogenética.

Es importante recordar que la diversidad es una propiedad que observamos acerca de las comunidades microbianas y es una medida que se obtiene por índices estadísticos y esta medida nos permite desarrollar hipótesis acerca de los mecanismos que vuelven a

las comunidades bacterianas dinámicas. Un reto inherente es que no existe un un valor universal y absoluto de diversidad para una comunidad dada (Shade, 2016).

La evaluación de la diversidad genética en este caso el valor de π , se ha utilizado ampliamente desde que se dio a conocer por Nei en 1987 hasta la fecha en diversos estudios, en algunos de ellos se toman en cuenta para la evaluación de estos valores más de un locus y poder finalmente dar una conclusión de la diversidad genética de los microorganismo de interés (Fong, y col., 2015 Bimolata y col. 2015; Aguilar-Melendez , y col., 2009).

La diversidad por grupo se ve confirmada en la figura 22 donde se distingue la distribución de las cepas en el árbol tanto del grupo B y el grupo D que son los que tienen los valores más altos del índice de diversidad y el grupo A se distingue agrupado casi en su mayoría en un grupo monofilético en la parte inferior del árbol generado a partir de las secuencias obtenidas a partir de la colección de cepas de éste proyecto.

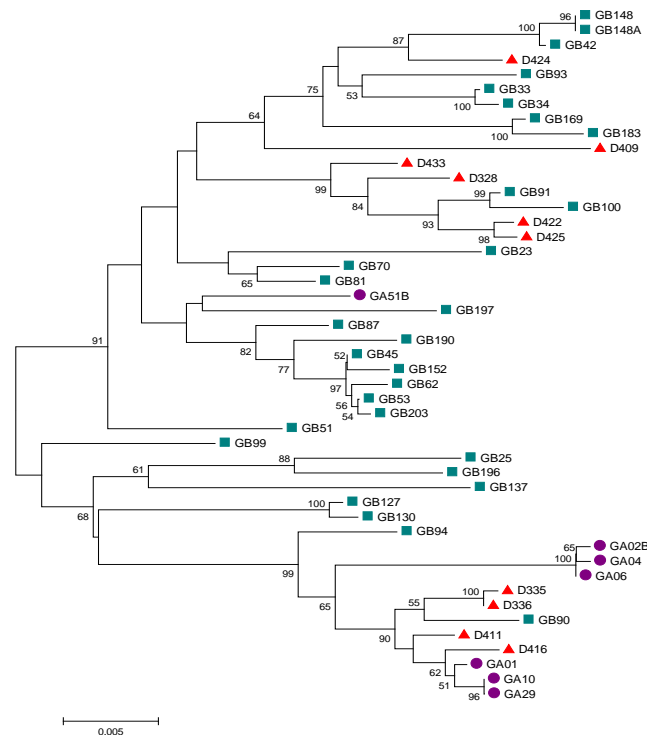


Figura 22. Árbol filogenético obtenido por el método de Neighbor Joining con el modelo de sustitución Jukes-Cantor y Bootstrap de 1000 repeticiones para secuencias parciales del gen ribosomal 16S rDNA de cepas aisladas en este proyecto. Se distingue el grupo A por el círculo morado, el grupo B por el cuadro verde y el grupo D por el triangulo rojo.

VIII. Conclusiones

1. Se identificaron especies pertenecientes al género *Burkholderia* a partir de los aislamientos realizados en el estado de Puebla
2. La presencia del género *Burkholderia* en el Estado de Puebla para este estudio se limitó a las regiones con climas y tendencia a pH ácido para la mayoría de los aislamientos de La Paz Tlaxcolpan, San Miguel Atlapulco (grupo A), Chignahuapan (grupo B), Cuetzalan y Tlatlauquitepec (grupo D).
3. El uso de los oligonucleótidos Bf y Br, ayudaron sustancialmente a la selección de cepas con potencial de pertenecer al género *Burkholderia*.
4. Se obtuvo un total de 47 *Burkholderia* spp. con baja diversidad genética para el marcador molecular del gen que codifica la subunidad 16S ribosomal.
5. Se generó el árbol filogenético que concuerda con lo reportado en la bibliografía.
6. Los hospederos con mayor número de especies aisladas fueron; pino, maíz y helecho.
7. Según la huella genética obtenida mediante BOX-PCR el hospedero con mayor variedad de cepas es el pino.
8. Existen cepas en este estudio con potencial de ser nuevas especies.

IX. Perspectivas

1. El estudio puede ser complementado secuenciando genes de mantenimiento para comprender aún mejor las relaciones de este género con la taxonomía actual a nivel de especie
2. Estudiar el posible rol que desempeñan las especies obtenidas con los hospederos que deberá ser abordado con técnicas específicas para determinar su potencial uso biotecnológico.
3. Las posibles nuevas especies deberán ser sometidas a estudios de taxonomía polifásica.

Bibliografía

- Aguilar-Melendez , A., Morreli, P. L., Roose, M. L., & Kim, S.-C. (2009). Genetic Diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annum*; *Solanaceae*) from Mexico. *American Journal of Botany*, 96(6), 1190-1202.
- Aizawa, T., Bao Ve, N., Vijarnsorn, P., Nakajima, M., & Sunairi , M. (2010). *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminum-tolerant bacteria isolated from Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) growing in highly acidic swamps in South-East Asia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2036-2041.
- Alisi, C., Jona Lasinio, G., Dalmastri, C., Sprocati, A., Tabacchioni, S., Bevivino, A., & Chiarini, L. (2005). *Burkholderia ambifaria*, and *Burkholderia pyrrocinia* Isolates from Maize Rhizosphere. *Microbial Ecology*, 50(3), 385-395.
- An, D., Im, W., Yang, H. C., Yang, D. C., & Lee, S. T. (2005). *Dyella ginsengisoli* sp. nov., a β -glucosidase-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 1625–1628.
- Ballard, R., Palleroni, N. J., Doudoroff, M., & Stanier, R. (1970). Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. alliicola* an *P. caryophylli*. *Journal of General Microbiology*, 60, 199-214.
- Bergey's Manual of Systematics of Archaea and John Wiley & Sons, Inc. (27 de Agosto de 2014). *LPSN*. Obtenido de List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: <http://www.bacterio.net/burkholderia.html#r>
- Bernabeu, P. R., Pistorio, M., Torres-Tejerizo, G., Estrada-De los Santos, P., Galar, M. L., Boiardi, J. L., & Luna, M. F. (2015). Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. *Scientia Horticulturae*, 191, 113–120.
- Bimolata, W., Kumar, A., Reddy , S. K., Meenaks, R., Laha, G. S., Qureshi, I. A., & Ghazi, I. A. (2015). Nucleotide Diversity Analysis of Three Major Bacterial Blight Resistance Genes in Rice. *PLoS One.*, 10(3).
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2). Springer.

- Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., & Estrada de los Santos, P. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1165–1172.
- Capello, R., Donovanos, C., & Giono, S. (2000). La diversidad microbiana en México. *CONABIO. Biodiversitas*, 32, 6-10.
- Castorena, G., Mugica, V., Le Borgne, S., Acuña, M., Bustos-Jaimes, I., & Aburto, J. (2006). Carbazole biodegradation in gas oil/water biphasic media by a new isolated bacterium *Burkholderia* sp. strain IMP5GC. *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072.
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 5(9), 719–729.
- Coenye, T., Laevens, S., Willems, A., Ohlén, M., Hannant, W., Govan, J. R., . . . Vandamme, P. (2001). *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples., 51, 1099-107.
- Currie, B. J., Fisher, D. A., Howard, D. M., Burrow, J. N., Lo, D., Selva-Nayagam, S., . . . Krauze, V. L. (2000). Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 31(4), 981-986.
- De Meyer, S. E., Cnockaert, M., Ardley, J. K., Maker, G., Yates, R., Howieson, J. G., & Vandamme, P. (2013). *Burkholderia sprentiae* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3950-3957.
- DeShazer, D. (2007). Virulence of clinical and environmental isolates of *Burkholderia oklahomensis* and *Burkholderia thailandensis* in hamsters and mice. *Federation of European Microbiological Societies*, 277(1), 64-69.

- El-Banna, N., & Winkelmann, G. (1998). Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, *85*, 69–78.
- Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., & Caballero-Mellado, J. (2001). *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(6), 2790-8.
- Estrada-de los Santos, P., Vinuesa, P., Matínez, L., Hirsch, A., & Caballero Mellado, J. (2013). Phylogenetic Analysis of Burkholderia Species by Multilocus Sequence Analysis. *Current Microbiology*, *67*, 51-60.
- Estrada-de-los-Santos, P., Rojas-Rojas, F. U., Tapia-Garcia, E. Y., Vásquez-Murrieta, M. S., & Hirsch, A. M. (2015). To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Annals of Microbiology*.
- Fong, M. Y., Ahmed, M. A., Wong, S. S., Lau, Y. L., & Sitam, F. (2015). Genetic Diversity and natural selection of *Plasmodium knowlesi* circumsporozoite protein nonrepeat regions. *PLOS ONE*, *10*(9), 1-14.
- Gillis, M., Van Van, T., Bardin, R., Goor, M., Hebbbar, P., Willems, A., . . . Fernandez, M. P. (1995). Poliphasy taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *45*, 274-289.
- Glass, M. B., Gee, J. E., Steigerwalt, A. G., Cavuoti, D., Barton, T., Hardy, R. D., . . . Wilkins, P. P. (2006). Pneumonia and septicemia caused by *Burkholderia thailandensis* in the United States. *J. Clin. Microbiol*, *44*, 4601–4604.
- Godfray, H. J., & Lawton, J. H. (2001). Scale and species numbers. *Trends in Ecology & Evolution*, *16*(7), 400-404.

- Goris, J. D.-M.-H. (2004). Classification of the PCB- and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, *54*, 1677-1681.
- Goris, J., Dejonghe, W., Falsen, E., De Clerck, E., Geeraerst, B., Willems, A., . . . De Vos, P. (2002). Diversity of transconjugants that acquired plasmid pJP4 or pEMT1 after inoculation of a donor strain in the A- and B-horizon of an agricultural soil and description of *Burkholderia hospita* sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*, *25*(3), 340-52.
- Goto, K., & Ohata, K. (1956). New bacterial diseases of rice (brown stripe and grain rot). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, *21*, 46-47.
- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de coillbacille. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, *93*, 1040-1041.
- Gu, J. Y., Zang, S. G., Sheng, X. F., He, L. Y., Huang, Z., & Wang, Q. (2015). *Burkholderia susongensis* sp. nov., a mineral-weathering bacterium isolated from weathered rock surface. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *65*, 1031-1037.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, *41*, 95-98.
- Hauser, A. R., Jain, M., Bar-Meir, M., & McColley, S. A. (2011). Clinical signification of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 29-70.
- Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Diallo, B., El Jaziri, M., & Vandeputte, O. (2010). Cell-free culture medium of *Burkholderia cepacia* improves seed germination and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). *Plant Growth Regulation*, *60*(3), 191-197.
- Keith, L., Sewake, K., & Zee, F. (2005). Isolation and Characterization of *Burkholderia gladioli* from Orchids in Hawaii. *Plant Disease*, *89*(12), 1273-1278.

- Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M., & Schleifer, K. H. (1996). Recent change in the classification of the pseudomonads: an overview. *Syst. Appl. Microbiol*, 19, 465-477.
- Kim, H. B., Park, M. J., Yang, H. C., An, D. S., Jin, H. S., & Yang, D. C. (2006). *Burkholderia ginsengisoli* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 56(11), 2529-33.
- Kim, S., Lowman, S., Hou, G., Now, J., Flinn, B., & Mei, C. (2012). Growth promotion and colonization of switchgrass (*Panicum virgatum*) cv. Alamo by bacterial endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1).
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-349.
- Kumar Arora, P., Srivastava, A., & Pal Singh, V. (2013). Novel degradation pathway of 4-chloro-2-aminophenol via 4-chlorocatechol in *Burkholderia* sp. RKJ800. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 2298-2304.
- Kumar, S., Vikram, S., & Raghava, G. P. (2013). Genome annotation of *Burkholderia* sp. SJ98 with special focus on chemotaxis genes. *PLoS*, 8(8), e70624.
- Kurepin, L. V., Park, J. M., Lazarovitz, G., & Hüner, N. P. (2015). Involvement of plant stress hormones in *Burkholderia phytofirmans*-induced shoot and root growth promotion. *Plant Growth Regulation*, 77(2), 179-187.
- Kwak, Y., & Shin, J. (2015). Complete genome sequence of *Burkholderia pyrrocinia* 2327(T), the first industrial bacterium which produced antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *Journal of Bacteriology*, 211, 3-4.
- Lane, D., Weisburg, W., Barns, S., & Pelletier, D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. a. Stackebrandt, *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. (págs. 115-175). New York, NY: Stackebrandt, E., and Goodfellow, M.
- Lenski, R. E., & Riley, M. A. (2002). Chemical warfare from an ecological perspective. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 556-558.

- Li, W., Roberts, D. P., Dery, P. D., Meyres, S., Lohrke, S., Lumsden, R., & Hebbbar, K. (2002). Broad spectrum antibiotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BCF. *Crop Protection*, 21, 129-135.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Lim, J., Baek, S. H., & Lee, S. (2008). *Burkholderia sediminicola* sp. nov., isolated from freshwater sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 58, 565-569.
- Lineda, A. T., Martine, L., Virgine, P., Laure, D., Sylvain, B., & Patrick, A. G. (2008). Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas*, and related organisms derived from rpoB, gyrB and rrs gene sequences. *Research in Microbiology*, 159, 169-177.
- LiPuma, J. J. (2007). Update on *Burkholderia* Nomenclature and Resistance. *Clinical Microbiology Newsletter*, 29(9), 65-69.
- Liu, X. Y., Li, C. X., Luo, X. J., Lai, Q. L., & Xu, J. (2014). *Burkholderia jiangsuensis* sp. nov., a methyl parathion degrading bacterium, isolated from methyl parathion contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 64, 3247-53.
- Lou, M., Fang, Y., Zhang, G., Xie, G., Zhu, B., & Ibrahim, M. (2011). Diversity of *Burkholderia cepacia* complex from the Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) rhizosphere soil. *Current Microbiology*, 62(2), 650–658.
- Louws, F., Fulbright, D., Taylor-Stephens, C., & Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol*, 60, 2286-2295.
- Madigan, M., MarTinko, J., Bender, k., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). Chapter 15 Diversity of Bacteria. En M. T. Madigan, J. M. MarTinko, k. S. Bender, D. H. Buckley, & D. Stahl, *Brock Biology of Micoorganisms* (14^o ed., págs. 399-490). Pearson.

- Maeda, Y., Shinohara, H., Kiba, A., Ohnishi, K., Furuya, N., Kawamura, Y., . . . Hickichi, Y. (2006). Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using gyrB and rpoD sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1031-1038.
- Marín-Cevada, V., Muñoz-Rojas, J., Caballero-Mellado, J., Mascarúa-Esparza, M., Castañeda-Lucio, M., Carreño López, R., . . . Fuentes-Reyes, L. (2012). Antagonistic interactions among bacteria inhabiting pineapple. *Applied Soil Ecology*, 61, 230–235.
- Matsuoka, H., Miura, A., & Hori, K. (2009). Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(4), 401–408.
- McCormick, J. B., Weaver, R. E., Hayes, P. S., & Boyce, J. M. (1977). Wound infection by an indigenous *Pseudomonas pseudomallei*-like organism isolated from the soil: case report and epidemiologic study. *J Infect Dis*, 135, 103-107.
- McLaughlin, S. B., & Kszos, L. A. (2005). Development of switchgrass (*Panicum virgatum*) as a bioenergy feedstock in the United States. *Biomass and Bioenergy*, 28(6), 515-535.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- Normand, P., Duran, R., Le-Roux, X., Morris, C., & Poggiale, J.-C. (2015). Biodiversity and Microbial Ecosystems Functioning. En J.-C. Bertrand, P. Caumette, P. Lebaron, R. Matheron, P. Normand, & T. Sime-Ngando (Edits.), *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications* (págs. 261-291).
- Onofre-Lemus, J., Hernandez-Lucas, I., Girard, L., & Caballero-Mellado, J. (2009). ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Appl Environ Microbiol.*, 75(20), 6581-90.

- Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M. A., Oliveira Chueire, L. M., Tiedje, J. M., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2012). Genome Sequences of *Burkholderia* sp. Strains CCGE1002 and H160, Isolated from Legume Nodules in Mexico and Brazil. *Journal of Bacteriology*, 194(24), 6924.
- Øvreås, L. (2000). Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters*, 3(3), 236-251.
- Padrenas, G. A., Ross, B. N., & Torres, A. G. (2016). Burkholderia cepacia Complex Vaccines: Where Do We Go from here? *Vaccines (Basel)*, 4(10).
- Palleroni, N. J. (1984). Genus I Pseudomonas Migula 1894 273. En W. & Wilkins., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pág. 273). Baltimore, U.S.A.: Krieg, N.R., and Holt, J.G.
- Palleroni, N. J., & Holmes, B. (1981). *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31(4), 479-481.
- Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., & Doudoroff, M. (1973). Nuclei acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. Sys. Bacteriol.*, 23, 333-339.
- Palleroni, N., Ballard, R. W., Ralston, E., & Doudoroff, M. (1972). Deoxyribonucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, 110, 1-11.
- Pandey, J., Sharma, N. K., Khan, F., Ghosh, A., Oakeshott, J. G., Jain, R. K., & Pandey, G. (2012). Chemotaxis of *Burkholderia* sp. Strain SJ98 towards chloronitroaromatic compounds that it can metabolise. *BMC Microbiol.*
- Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: structure, function, an applications. *Biotechnological Advances*, 21, 465-499.
- Parke, J., & Gurian-Sherman, D. (2001). Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 225-258.
- Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Castro-Gonzalez, R., Estrada-de los Santos, T., Cabeellos-Avelar, T., Guedes, H., . . . Caballero-Mellado, J. (2006). Diazotrophic

Burkholderia Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3103–3110.

Perin, L., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., Valdani, J. I., Estrada-de los Santos, P., Reis, V. M., & Caballero-Mellado, J. (2006). *Burkholderia silvatlantica* sp. nov. A novel diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 1931-1937.

Reis, V. M., Estrada-de-los-Santos, P., Tenorio-Salgado, S., Vogel, J., Stoffels, M., Guyon, S., . . . Caballero-Mellado, J. (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2155–2162.

Sawana, A., Adeolu, M., & Gupta, R. (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in Genetics*, 5(429), 1-19.

Sessistch, A., Coenye, T., Sturz, A.V., Vandamme, P., Barka, E.A., Salles, J.F., Van Elsas, J. D., Faure, D., Reiter, B., Glick, B. R., Wang-Pruski, G. and Nowak, J. (2005). *Burkholderia phytofirmans* sp. nov. a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1187-1192.

Shade, A. (2016). Diversity is the question, not the answer. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 1-6.

Shimantani, K. (1999). The appearance of a different DNA sequence may decrease nucleotide diversity. *Molecular Evolution*, 49, 810-813.

Singh, A. K., Shrivastava, S., Kumar, S., Pal, V., & Gopalan, N. (2015). Batch Fermentation of Recombinant *Burkholderia* Intracellular Motility A Protein in *Escherichia coli* for the Diagnosis of Equine Glanders. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35, 124-129.

- Solbrig, O. T. (Ed.). (1991). *From genes to ecosystems : a research agenda for biodiversity: report of a IUBS-SCOPE-Unesco workshop*. MA, Petersham, USA.
- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J., & Doudoroff, M. (1966). The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology*, 43, 159-271.
- Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendoça-Previato, L., James, E. K., & Venturi, V. (2012). Common Features of Enviromental and Potentially Benefical Plant-Associated *Burkholderia*. *Microb. Ecol.*, 63, 249-266.
- Takahashi, Y., Takahashi, K., Watanabe, K., & Kawano, T. (2004). Bacterial black spot caused by *Burkholderia andropogonis* on *Odontoglossum* and intergeneric hybrid orchids. *Journal of General Plant Pathology*, 70(5), 284-287.
- Tamura , K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar , S. (2013). Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:(30), 2725-2729.
- Tindall , B. J., Rossello-Mora , R., Busse, H. J., Ludwig , W., & Kampfer , P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 249-266.
- Vacaseydel Aceves, N. B. (20 de 01 de 2012). Aislamiento y diversidad de especies del género *Burkholderia* en el estado de Tamaulipas. México.
- Vandamme , P., Mahenthiralingam, E., Holmes, B., Coenye, T., Hoste, B., De Vos, P., . . . Speert, D. (2000). Identification and Population Structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* Genomovar IV). *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1042-1047.
- Vandamme , P., Goris, J., Chen, W. M., de Vos, P., & Wilems, A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol*, 25(4), 507-512.
- Vandamme, P., De Brandt, E., Houf, K., Salles, J. F., Dirk van Elsas, J., Spilker, T., & Lipuma, J. J. (2013). *Burkholderia humi* sp. nov., *Burkholderia choica* sp. nov., *Burkholderia telluris* sp. nov., *Burkholderia terrestris* sp. nov. and *Burkholderia*

- udeis* sp. nov.: *Burkholderia glathei*-like bacteria from soil and rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4707-4718.
- Vanlaere , E., Lipuma, J., Baldwin , A., Henry, D., De-Brand, E., Mahenthiralingam , E., . . . Vandamme , P. (2008). *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, 1580-90.
- Vázquez, J. A., & Berrón , S. (2004). Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(2), 113-120.
- Wang, X. Q., Showmaker, K. C., Yu, X. Q., Hsu, C. Y., Baird, S. M., Peterson , D. G., . . . Lu, S. E. (2014). Draft Genome Sequence of *Burkholderia pyrrocinia* Lyc2, a Biological Control Strain That Can Suppress Multiple Plant Microbial Pathogens. *Genome Announcements*, 2(5).
- Weisberg, W., Barns, S., Pelletier, D., & Lane, D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703.
- Winsor , G., Khaira , B., Van Rossum, T., Lo, R., Whiteside, M., & Brinkman, F. (1 de Dec de 2008). *The Burkholderia Genome Database: facilitating flexible queries and comparative analyses*. Obtenido de <http://www.burkholderia.com>
- Woese, C. R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.*, 51, 227-271.
- Woese, C. R. (1998). The Universal Ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 6854-6859.
- Yabuuchi, E., Kosako , Y., Yano , I., Hotta, H., & Nishiuchi, Y. (1995). Transfers of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.*, 39, 897-904.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto , Y., . . . Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the

genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*. *Microbiology and Immunology*, 36, 1251-1275.

Yang, H., Im, W. T., Kim, K. K., An, D. S., & Lee, S. T. (2006). *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 453-457.

Zhang, J.-H., Wang, F., & Wan, T.-Y. (2011). A simple and effective SuperBuffer for DNA agarose electrophoresis. *Gene*, 487(1), 72-74.

ANEXO I (SECUENCIAS).

>GA01

TCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATA
CCGCATACGATCCACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGCCCTCGCGCTATAGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACGACCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCC
AGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAATCCTCTGCTCTAATACAGTCCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCAC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGCAGCGGTTTGTAAAGCCGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACTGGAACTGCATTGGTACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
GGCGAAGGCAGCCCTGGCCAACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
TGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGG
ATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCCTGACATGGTCCGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGTCTCGAAAGAGAACCAGCGCACAGGTGCTGC
ATGGCTGCTGCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTGTAGTGTACGCAAGAGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAAATGGTCCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAAT
CCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTG
TACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCCGAAGGAGG

>GA02B

CAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACG
ATCCATGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGCCCTCGCGCTATAGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTG
GTCTGAGAGGACGACGACCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCC
CGCTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAATCCTGAGGGCTAATATCCTTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGCAGCGGTTTGTAAAGCCGATGTGAAATCCCAGGGCTCAA
CCTGGAACTGCATTGGTACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGC
AGCCCCCTGGCCAACTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGATTCA
TTTCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGA
TTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCCTGACATGGTCCGAACCTTGGAGAGATCTGAGGGTCTCGAAAGAGAACCAGATACACAGGTGCTGCATGGCTGTCG
TCAGTCTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTGTAGTGTACGCAAGAGCACTTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGAATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCCGGAACAGAGGGTCCGCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAA
CCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCC
CCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCCGAAGGAGG

>GA04

AACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATACCG
CATACGATCCATGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGCCCTCGCGCTATAGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGT
AGCTGTCTGAGAGGACGACGACCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCCAGCA
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAATCCTGAGGGCTAATATCCTTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACGGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGCAGCGGTTTGTAAAGCCGATGTGAAATCCCAGGG
CTCAACTGGAACTGCATTGGTACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCG
AAGCCAGCCCTGGCCAACTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGG
GATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGA
TGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCCTGACATGGTCCGAACCTTGGAGAGATCTGAGGGTCTCGAAAGAGAACCAGATACACAGGTGCTGCATGG
CTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTGTAGTGTACGCAAGAGCACTTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCCG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCCGGAACAGAGGGTCCGCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCA
GAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACA
CACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCCGAAGGAGG

>GA06

TCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATA
CCGCATACGATCCATGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGCCCTCGCGCTATAGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACGACCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCC
AGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAATCCTGAGGGCTAATATCCTTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCAC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGCAGCGGTTTGTAAAGCCGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACTGGAACTGCATTGGTACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
GGCGAAGGCAGCCCTGGCCAACTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
TGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGG

ATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCCTTGACATGGTCGGAACCTTGGAGAGATCTGAGGGTGTCTGAAAGAGAACCATACACAGGTGCTGC
ATGGCTGTCTGACAGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGTGGGGATGACGTC AAGTCCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCCGCAACCCCGAGGGGGAGCTAA
TCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTT
GTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGG

>GA10

CGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGCTCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATACCGCA
TACGATCCACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAG
CTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAA
TGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGCCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTAGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTGTCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGC
TCAACTGGGAAGTGCATTGGTACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
AGGCAGCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACCGATGCAACTAGTTGTTGGG
ATTCATTTCTTAGTAACGTAGTAAACGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAAGCGGTGGATGAT
GTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGTGTCTGAAAGAGAACCAGGCGCACAGGTGCTGCATGG
CTGCTGACAGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGAACAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTCGCAACCCCGAGGGGGAGCTAATCCCA
GAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACA
CACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAG

>GA29

TGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGCTCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGGA
TTAATACCGCATACGATCCACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCG
ACGATCAGTAGCTGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGACAATGGGCGAAAGCCT
GATCCAGCAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGCCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATA
AGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTAGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTGTCTAAGACCGATGTGAA
ATCCCCGGGCTCAACTGGGAAGTGCATTGGTACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATA
CCGATGGCGAAGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAACTCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCAACTAG
TTGTTGGGATTCAATTTCTTAGTAACGTAGTAAACGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAAGCG
GTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGTGTCTGAAAGAGAACCAGGCGCACAGGTG
CTGCATGGCTGTGCTGACGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTCGCAACCCCGAGGGGGAG
CTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGG
TCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAG

>GA51B

GGCAGCACGGGGCAACCCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCTCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAC
GCTCTGCGGAGAAAGCGGGGCTCCTTCGGGACCTCGCGCTACAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAG
CTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAAT
GCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAAACCTCAGCCCTAATACGGCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTAGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTCGCTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGC
TTAACCCTGGGAAGTGCATTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
AGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCAACTAGTTGTCGGGC
CTTCATTGGCTTGGTAACGTAGTAAACGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAAGCGGTGGATGAT
GTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCCTTGACATGTACGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGTGCCGAAAGGAGCCGTAAACAGGTGCTGCATGGC
TGTCTGACGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCCAGGAGACTGCCGGTGAACAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACCGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCCGCAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCC
AGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTAC
ACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAG

>GB23

TCGAACGGCAGCACGGGGCAACCCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCTCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATACC
GCATACGATCTGCGGATGAAAGCGGGGATCCTTCGGACCTCGCGCTGACGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCT
GTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGACAATGGGGCAACCCCTGATCCAG
CAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAAACGCTCTGTTAATACCCGGGGCGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCAC

GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAACGCGTAACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCGAGCGGTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCC
GGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTGGTACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
CGGAAGGCAGCCCCCTGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTC
GGGTCTTCACTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGG
ATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAAGTCTGCCGAGAGTGGATGTGCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGC
ATGGCTGTCGTAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGTGGGGATGACGAGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCCGCAACCCGAGGGGGAGCC
AATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTC
TTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAG

>GB25

CGGCAGCACGGGGCAACCCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGAACGTGTCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGCAAGCCGGATTAATACCGCATA
CGACCTAAGGGAGAAAGCGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTATAGGGCGCGCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGC
TGGTCTGAGAGGACGACCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCCCTGATCCAGCAAT
GCCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAAACCTTCTGCCCTAATATGGATGGAGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCGAGCGGTTGTTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCT
TAACCTGGGAAGTGCATTGGTACTGGCAGGCTTTGAGTGTGGCAGAGGGGGTGAATTCACGCTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
AGGCAGCCCTGGGCCAACACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGG
ATTCATTTCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGAT
GTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTGCAGAACCTGTGAAAGTGGGGGCTCGAAAGAGAACCAGGCGCACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCCGAGGTGGAGCCAATCCAG
AAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACAC
ACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAAGG

>GB33

TCGAACGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGAACGTGTCTGGAGTGGGGATAGCCCGCGCAAGCCGGATTAATACC
GCATACGCTCTGTGGAGAAAGGGGGGATCTTCGGACCTCTCGCTCAAGGGCGCGCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCT
GTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCCCTGATCCAG
CAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAAACCTTCTGCCCTAATACGGCGGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAACGCGTAACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCGAGCGGTTGTTAAGACAGATGTGAAATCCCC
GGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGTACTGGCGGACTCGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGCTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
CGGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTC
GGGTCTTCACTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGG
ATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAATCTGCTGAGAGTGGGAGTCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGC
ATGGCTGTCGTAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTCAGGGAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCCGCAACCCCGAGGGGGAGCCA
ATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT
TGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAAGG

>GB34

CGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGAACGTGTCTGGAGTGGGGATAGCCCGCGCAAGCCGGATTAATACCGCATA
GCTCTCTGGAGAAAGGGGGGATCTTCGGACCTCTCGCTCAAGGGCGCGCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCT
GGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCCCTGATCCAGCAATGC
CGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAAACCTTCTGCCCTAATACGGCGGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAACGCGTAACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCGAGCGGTTGTTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTT
AACCTGGGAAGTGCATTTGTACTGGCGGACTCGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGCTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
GCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTCGGGCTT
CATTGACTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGT
GGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAATCTGCTGAGAGTGGGAGTCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTACGCTGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTCAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGAAGACGTAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCCGCAACCCCGAGGGGGAGCCAATCCAG
AAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACAC
ACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAAGGAG

>GB42

TCGAACGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGGAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACC
GCATACGCTCTGTGGAGAAAGCGGGGATCGAAGACCTCGCGCTCAAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCT
GTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAG
CAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCCTGGTTAATACCCGGGAGGATGACGGTACCAGGAAGATAAGCACCG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTCGTTAAGACAGATGTGAAATCCCCG
GGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGTACTGGCGGACTCGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTAAATCGGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGG
CGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTGCG
GGCCTTCATTGGCTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA
TGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAACCTGGCTGAGAGGTGGGGTGCCTGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTGACGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCCAGGAGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTATACAAATGGTGGAAACAGAGGGTCCGCAACCCGCGAGGGGGAGCCAA
TCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTT
GTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCCG

>GB45

GGCAGCACGGGGCAACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAC
GCTCTACGGAGAAAGGGGGGATCTTAGGACCTCCCGCTACAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCT
GGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGC
CGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCCGCCCTAATATGGTGGGGGATGACGGTACCAGGAAGATAAGCACCGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTAGTGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTCCGCTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTT
AACCTGGGAAGTGCATTTGTACTGGCGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTAAATCGGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
GCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGATT
CATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTG
GATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAACCTGCTGAGAGGTGGGGTGCCTGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTATACAATGGTGGAAACAGAGGGTCCGCAACCCGCGAGGGGGAGCCAAATCCAGAA
AACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACAC
CGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCCGAAAGGA

>GB51

TCGACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATCCATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCG
CATACGATCTGTGGATGAAGAGCGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTACAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGT
AGCTGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCA
ATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCGTGTTAATACCCGTGGGGGATGACGGTACCAGGAAGATAAGCACCGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTCCGCTAAGACAGATGTGAAATCCCCGG
GCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGTACTGGCGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTAAATCGGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGC
GAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGG
GGATTCAATTCCTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATG
ATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAACCTGGCTGAGAGGCGGGGTGCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCATG
GCTGTCTGACGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGTGAAGTCCCGGTGACAAACCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTATACAATGGTGGAAACAGAGGGTCCGCAACCCGCGAGGGGGAGCCAAATCC
CAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGT
CACACCGCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCCGAAAGGA

>GB53

GTCGAACGGCAGCACGGGGCAACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATAC
CGCATACGCTCTACGGAGAAAGGGGGGATCTCAGGACCTCCCGCTACAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATC
TGTAGCTGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCC
AGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCCGCCCTAATATGGTGGGGGATGACGGTACCAGGAAGATAAGCAC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTCCGCTAAGACAGATGTGAAATCCC
CGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGTACTGGCGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTAAATCGGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
GGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
TGGGGATTCAATTCCTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG
GATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAACCTGCTGAGAGGTGGGGTGCCTGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTG
CATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGAGACTGCCGGTGACAA

ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACAGTCATAACAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCCAACCCCGGAGGGGGAGCCA
ATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT
TGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGA

>GB62

CGGCAGCACGGGGGCAACCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATA
CGCTCTACGAGGAAAGGGGGGATCTAAGGACCTCCCGCTACAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGGCACGATCTGTAGC
TGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATG
CCGCGTGTGTGAAGAAGGCCGTCGGGTTGTAAGCACTTTGGTCCGAAAGAAAACCTCCGCCCTAATATGGTGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTCCGAGGCCGCTAAGACAGATGTGAAATCCCGGGCTA
TAACCTGGGAACCTGCATTTGTACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACAGTGTAGCAGTGAATCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAA
GGCAGCCCGCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGA
TTCATTTCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATG
TGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCTACCCCTTACATGTATGGAACCTGTGAGAGTGGGGTCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCATGGCT
GTGCTCAGTCTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACAGTCATAACAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCCAACCCCGGAGGGGGAGCCAATCCA
GAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACA
CACCGCCGCTCACACCATGGGAGTGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGG

>GB70

TCGACGGCAGCAGGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCG
CATACGATCTGTGGATGAAAGCGGGGGATCCTTCGGGACCTCGCGCTACAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGGCACGATC
TGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCA
GCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAAACCTCGTGGTTAATACCCGTGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTCCGAGGCCGTTCCGCTAAGACAGATGTGAAATGCC
GGCTTAACCTGGGAACCTGCATTTGTACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACAGTGTAGCAAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
GCGAAGGCAGCCCGCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTC
GGGTCTTATTGACTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGG
ATGATGTGATTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCTACCCCTTACATGTATGGAATCCTGTGAGAGTGGGAGTCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGTTGC
ATGGCATGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACAGTCATAACAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCCAACCCCGGAGGGGGAGCCA
ATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT
TGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGG

>GB81

TCGAACGGCAGCAGGGGGCAACCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACC
GCATACGATCTGCGGATGAAAGCGGGGATCCTTCGGGACCTCGCGCTGCAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGGCACGAT
CTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC
AGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAAACCTTGGTTAATACCCGAGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCAC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTCCGAGGCCGTTCCGCTAAGACAGATGTGAAATCCC
CGGGCTTAACCTGGGAACCTGCATTTGTACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACAGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
GGCGAAGGCAGCCCGCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTG
CGGGTCTTATTGACTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG
GATGATGTGGATTAAATCGATGCAACGCGAAAACCTTACCTACCCCTTACATGTATGGAATCCTGTGAGAGTGGGGTCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTG
CATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGGGAC
AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACAGTCATAACAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCCAACCCCGGAGGGGGAGC
CAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGT
CTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGG

>GB87

TCGACGGCAGCAGGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACC
CATACGCTCTACGAGGAAAGGGGGGATCTTAGGACCTCCCGCTACAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGGCACGATCTG

TAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGC
AATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAAACCTCCGCCCTAATATGGTGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTGCCGAGCCGGTCCGCTAAGACAGATGTGAAATCCCCG
GGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGG
CGAAGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTGCG
GGTCTTATTGACTTGGTAACTAGTAAACGCTGAAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGGAT
GATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGTGCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCAT
GGCTGTCGTAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTGCCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAAAT
CCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTT
GTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCCGAAGGAGG

>GB90

TGCAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGAT
TAATACCGCATACGATCTACCGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGCCCTACCAAGGCCGA
CGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATTGGCGAAAGCCCTG
ATCCAGCAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAAACCTTGGTTCTAATAGCCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAA
GCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGACCGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTGGTACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATCGCTAGAGATGTGGAGGAATAC
CGATGGCGAAGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAG
TTGTTGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCTGAAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCG
GTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGTGTCTGAAAGAGAACCAGTACACAGGTG
CTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGTATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGC
TAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGT
CTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCCGAAGGAGG

>GB91

TCGAACGGCAGCGGGGGCAACCTGGCGGCAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGGAGTGGGGGATAGCCCGCGCAAGCCGGATTAATAC
CGCATACGATCTATGGATGAAAGCGGGGACCGAAAGGCCCTCGCGCTCAAGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGCCCTACCAAGGCGACGATC
TGATGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCCA
GCAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAAACCTCCGTCCTAATACGGTGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCAC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGACCGATGTGAAATCCC
CGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTGGTACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATCGCTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
GGCGAAGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
CGGCTTTCATTGACTTGGTAAAGCAAGTAAACGCTGAAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTG
GATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAACCTTGCCGAGAGGTGAGGGTGCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTG
CATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCCCA
ATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCTGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT
TGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCCGAAGGAGGA

>GB93

TCGAACGGCAGCAGGACTTCGGTGGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGGAGTGGGGGATAGCCCGCGCAAGCCGGATTAATAC
GCATACGCTCTGAGGAGGAAAGCGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTCAAGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGCCCTACCAAGGCGACGATCT
GTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAAGCCCTGATCCAG
CAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAAACCTTCCGCTAATACGGCGGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGACAGATGTGAAATCCCC
GGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTGTGACTGGCGGACTCGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATCGCTAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
GCGAAGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGTTGTG
GGGCTTTCATTGCTTGGTAACTAGCTAACGCTGAAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGG
ATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAAGTCTGCTGAGAGGTGGATGTGCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTG
ATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCCA
ATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCTGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT
TGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCCGAAGGAGGA

>GB94

ACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGCCCTCGCGCTATAGGGTTG
GCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGCATCAGTACGTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAG
AAAACCTTTGGGCTAATACCTTGGGGATGACGGTACC CGGAAGAATAAGCACCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAAT
TACTGGGCGTAAAGCGTGCCGAGCGGTTTGTAAAGACCGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACGTCATTGGTACTGGCAAGCTAGAGTATGCGAGAGGGGG
TAGAATCCACGTGTAGCAGTAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCTTCGGCAACTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCCTGGGGAGTACG
GTCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGACAAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCTACCTTACATGGTCGGAAT
CCCGCTGAGAGGTGGGAGTCTCGAAAGAGAACC CGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTGCTCTTAGTTGCTACGCAAGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCGAAGTCTCATGGCCCTTAGGGTAGGGCTTACAC
GTCTACATAAGTTCGGAACGCGTCCCAACCCGCGAGGGGAGCTAATCCAGAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAACTGCAAGTGCCTGGAAGTGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTG

>GB99

CGGCAGCACGGGGCAACCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATA
CGATCTGCGGATGAAAGCGGGGATCCTTCGGGACCTCGCGCTGACGGGGCGCGGATGCGAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGCATCTGTA
GCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAA
TGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAAACTCTTGTTTAAATACCGGAGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGTGCCGAGCGGTTTCGCTAAGACAGATGTGAAATCCCGGGC
TTAACCTGGGAACGCAATTTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGCTGAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
AGGCAGCCCTTCGGCAACTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGG
ATTCATTTCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGACAAAGCGGTGGATGAT
GTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCTACCTTGACATGGTTCGGAATCCCGTGAGAGGTGGGAGTGTCTCGAAAGAGAACC CGGCGCACAGGTGCTGCATGG
CTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCTACGCAAGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTAGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTGGAAACAGAGGGTCCCAACCCGCGAGGGGAGCTAATCCCA
GAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACA
CACCGCCGTCACACCATGGGAG

>GB100

TCGAACGGCAGCGGGGGCAACCCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGGAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATAC
CGCATACGATCTCAGGATGAAAGCGGGGACCGAAAGGCCTCGCGCTCAAGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGCATC
TGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACCCGCGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCCA
GCAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAGCACTTTTGGTCCGGAAGAAAACTCCCTGCTAATACGGTGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCAC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTAGTGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGTGCCGAGCGGTTTCGCTAAGACCGATGTGAAATCCC
CGGGCTTAACTGGGAACGCAATTTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGCTGAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
GGCGAAGGCAGCCCTTCGGCAACTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
CGGGTCTTCACTGACTGGTAACGAGCTAACGCGTGAAGTTGACCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGACAAAGCGGTG
GATGATGGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCTACCTTGACATGTACGGAACCTTGGCGAGAGGTGAGGGTGCCTCGAAAGGAGCCGTAACACAGGTGCTG
CATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTATGTCCTAGTTGCTACGCAAGGACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGCATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTAGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTGGAAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAG
CCAAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGG
GTCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAAC

>GB127

TCGAACGGCAGCAGGGAGTAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACC
GCATACGATCTACGGAAGAAAGCGGGGATCCTTCGGACCTCGCGCTATAGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGCATCT
GTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAG
CAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGGTCCGGAAGAAAACTCTTGATAATACCTGAGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTAGTGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGTGCCGAGCGGTTTCGTTAAGACAGATGTGAAATCCCG
GGCTTAACTGGGAACGCAATTTGACTGGCGAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGCTGAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGG
CGAAGGCAGCCCTTCGGCAACTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTG
GGGATTCATTTCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGACAAAGCGGTGGAT
GATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCTACCTTGACATGGTTCGGAACCTTGGTGGAGACTAGGGGTGCTCGAAAGAGAACCAGTACACAGGTGCTGCAT

GGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACZAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACAGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCTAAGCCCGGAGGTGGAGCCAAATCC
CAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
CACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGCTAGTCTAACCGCAAGGAG

>GB130

TCGAACGGCAGCAGCGGAGTAACTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACC
GCATACGATCTACGGAAGAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTATAGGGCGCGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCT
GTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGCGAAAGCCGATCCAG
CAATGCCCGTGTGTGAAGAAGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAACCTCTTGATAAATACCTGAGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGTGCAGCGGTTTCGTTAAGACAGATGTGAAATCCCGG
GGCTTAACCTGGAACTGCATTTGTACTGGCGAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGG
CGAAGGCAGCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGTCAACTAGTTGTTG
GGGATTCATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGGAT
GATGTGGATTAATCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTGGAAACCTGGTGAGAGCTAGGGGTGCTCGAAAGAGAACCAGTACACAGGTGCTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTAAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACAGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCTAAGCCCGGAGGTGGAGCCAAATCC
CAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
CACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGCTAGTCTAACCGCAAGGAG

>GB137

TGCAGTCGAACGGCAGCAGCGGGGCAACCCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTA
ATACCCGATACGACCTGAGGGAGAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTAGAGGGCGCGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGAC
GATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGCGAAACCCCTGAT
CCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAACCTTCGCCCTAATACGGTGGGAGGCTGACGGTACCGGAAGAATAAGC
ACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGTGCAGCGGTTTGTAAAGACAGATGTGAAATC
CCCGGGCTAACCTGGAACTGCATTTGTACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCG
ATGGCAAGGCAGCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGTCAACTAGTT
GTTGGGATTCATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGT
GGATGATGTGGATTAATCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGACGGAACCCCTGCTGAAAGGTGGGGGTGCTCGAAAGAGACCCGTCGCACAGGTGCT
GCATGGCTGTCTGACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAGGCGCAACCCCTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGGTTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGACATACAATGGTCGGAACAGAGGGCTGCCAACCCGTGAGGGGGA
GCTAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGG
GTCTTGATACACCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGA

>GB148

TCGACGGCAGCAGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGGAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACC
CATACGCTCTGAGGAGGAAGCGGGGGCTCGCAAGACCTCGCGCTCAAGGGCGCGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTG
TAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGCGAAAGCCGATCCAGC
AATGCCCGCTGTGTGAAGAAGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAACCTTCCTGGTTAATACCCGGGAGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGTGCAGCGGTTTCGTTAAGACAGATGTGAAATCCCGG
GCTTAACCTGGAACTGCATTTGTACTGGCGGACTCGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGC
GAAGGCAGCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGTCAACTGGTTGTCGG
GCCTTCATTGGCTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGGAT
GATGTGGATTAATCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAACCTGGCTGAGAGGTGCGGGTGCAGGAGGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCCAGGGAGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACAGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCCCAACCCGAGGGGGAGCCAAAT
CCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGGGTGCAGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTT
GTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGA

>GB148A

TCGAACGGCAGCAGCGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGGAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACC
GCATACGCTCTGAGGAGGAAGCGGGGGCTCGAAGACCTCGCGCTCAAGGGCGCGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCT
GTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGCGAAAGCCGATCCAG

CAATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTTCTGGTTAATACCCGGGGAGGATGACGGTACCAGGAAGAATAAGCACCG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTGCAGCGGGTTCGTTAAGACAGATGTGAAATCCCCG
GGCTTAACTGGGAAGTGCATTTGTGACTGGCGGACTCGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGG
CGAAGGCAGCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTCG
GGCCTTATTGGCTTGGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA
TGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAACCTGGCTGAGAGTGGGGTCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCTGACGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCCAGGGAGACTGCCGGTACAAA
CCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCCGCAACCCCGCAGGGGGAGCCAA
TCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGGGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTT
GTACACACCCCGCTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGA

>GB152

CGGCAGCAGGGGGCAACCCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATA
CGCTCTACGGAGGAAAGGGGGGATCTTAGGACCTCCCGCTACAGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGGCAGCATCTGTAGC
TGGTCTGAGAGGACGACCCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCCTGATCCAGCAATG
CCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCCGCCCTAATATGGTGGGGGATGACGGTACCAGGAAGAATAAGCACCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTGCAGCGGGTCCGCTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGCT
TAACCTGGGAACGTGCATTTGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAA
GGCAGCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGA
TTCATTTCTTAGTAACTGAGTAACTGACGCTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATG
TGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAACCTGCTGAGAGTGGGGTCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGATGGCT
GTGCTGAGTCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCAGTACAAACCCGGA
GGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCCGCAACCCCGCAGGGGGAGCCAAATCCA
GAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACA
CACCGCCGCTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCG

>GB169

TGCAAGTCGAACGGCAGCAGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGGAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATT
AATACCGCATAACGCTCTGAGGAGGAAAGCGGGGATCTTTCCGGACCTCGCGCTCAAGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGGC
GACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGAGAGGCAGCAGTGGGAAATTTGGACAATGGGCGCAAGCC
TGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCCTGGGTTAATACCCCTGGGGGATGACGGTACCAGGAAGAAT
AAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTGCAGCGCGGTTCCGTAAGACAGATGTGA
AATCCCCGGGCTTAACTGGGAACGTGCATTTGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAT
ACCGATGGCGAAGGCAGCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACT
AGTTGTGGGCTTCTATTGACTTGGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG
CGGTGGATGATGTGATTAAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAAGTCTGCCGAGAGGTGACGTGCCGAAAGGGAGCCATAACACAGG
TGCTGATGGCTGTGCTGAGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCCAGGGAGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCCGCAAGCCCGCAGGTG
GAGCAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCC
GGTCTTGTACACACCCCGCTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGTAGTCTAACCGCAAGGA

>GB183

TGCAGTCGAACGGCAGCAGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGGAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTA
ATACCGCATAACGCTCTGAGGAGGAAAGCGGGGATCTTTCCGGACCTCGCGCTCAAGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGGC
ACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCATGGAATTTGACAAATGGGCGCAAGCCTG
ATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCCTGGGTTAATACCCCTGGGGGATGACGGTACCAGGAAGAATA
GCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTGCAGCGCGGTTCCGTAAGACAGATGTGAAA
TCCCCGGGCTTAACTGGGAACGTGCATTTGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATAC
CGATGGCGAAGGCAGCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAG
TTGTCGGGCTTCTATTGACTTGGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCG
GTGGATGATGTGATTAAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAAGTCTGCCGAGAGGTGACGTGCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTG
CTGATGGCTGTGCTGAGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCCAGGGAGACTGCCGGT
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCCGCAAGCCCGCAGGTGGA
GCCAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCC
GGTCTTGTACACACCCCGCTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGTAGTCTAACCGCAAGGA

>GB190

TGCAGTCGAACGGCAGCACGGGGCAACCCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTA
ATACCCGCATACGCTCTACGGAGGAAAGGGGGGATCTTAGGACCTCCCCTACAGGGGCGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGAC
GATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGAGGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGAAACCCCTG
ATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAGAAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCTGCCCTAATATGGTGGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAA
GCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGTGCCGAGGCGGTCGCTAAGCAGATGTGAAA
TCCCGGGCTTAACTGGGAAGTGCATTTGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATCGGTAGAGATGTGGAGGAATAC
CGATGGCGAAGGCAGCCCTGGGCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCGTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAG
TTGTGCGGGATTCTTTCCCTGGTAAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAGTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCG
GTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTT
CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGGACTCTAGGGAGACTGCCGGTG
ACAACCCGAGGAGAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTATACAATGTGCGAAGCAGAGGGTCCCAACCCGCGAGGGGGA
GCCAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCG
GGTCTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAG

>GB196

GCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCCGCATACGATCTACGGAAGAAAGCGGGGAT
CTTCGGACCTCGCGCTATAGGGGCGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAGAAAGGCCCTTCGG
GTTGTAAGCACATTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCTTGGTTAATACCTGAGGGGGATGACGTTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATA
CGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGTGCAGAGCGGCTGTGTTAAGACCGATGTGAAATCCCGGGCTTAACTGGGAAGTGCATTGGTACTG
GCAGGCTTTGAGTGTGGCAGAGGAGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCTCTGGGCAACACTGAC
GCTCATGCAGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGATTCTTTCCCTTAGTAACTAGCTAACG
CGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAGTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAA
CCTTACCTACCCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGGACTCTAAGGAGACTCCCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTC
CATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTATACAATGGTGCAGAACAGAGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAG
TCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGG
GTTTACCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGC

>GB197

TGCAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGGAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTA
ATACCCGCATACGCTCTACGGAGGAAAGGGGGGATCTTAGGACCTCTCGCTCAAGGGGCGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGAC
GATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGAGGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCGAAAGCCCTGA
TCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAGAAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACATTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCTGCCCCTAATACGGCGGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAG
CACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGTGCCGAGGCGGTTCCGTAAGACAGATGTGAAAT
CCCCGGCTTAACTGGGAAGTGCATTTGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACC
GATGGCGAAGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGT
TGTGCGGTCTTATTGACTTGGTAACTAGTAAACGCTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAGTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGG
TGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTT
TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGGACTCCAGGGAGACTGCCGGATT
GACAAACCGGAAGGAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTATACAATGGTGCAGAACAGAGGGTCCCAAGCCGCGAGGTG
GAGCCAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCG
GGTCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTAGGTAGCC

>GB203

TGCAGTCGACGGCAGCACGGGGCAACCCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTA
TACCCGCATACGCTCTACGGAGGAAAGGGGGGATCTCAGGACCTCCCCTACAGGGGCGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG
ATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGAGGGCAGCAGTGGGAATTTTGGACAATGGGGCGAAAGCCCTGATC
CAGCAATGCCGCGTGTGTGAGAAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACATTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCCGCCCTAATATGGTGGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCA
CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGTGCCGAGGCGGTCGCTAAGCAGATGTGAAATCC
CCGGCTTAACTGGGAAGTGCATTTGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGA
TGGCGAAGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTG
TTGGGGATTCTTTCCCTAGTAACTAGTAACTAGTAACTAGTAACTAGTAACTAGTAACTAGTAACTAGTAACTAGTAACTAGTAACTAGTAACTAGTAACTAGTAACTAGT
TGGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTT
CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGGACTCCAGGGAGACTGCCGGATT
GACAAACCGGAAGGAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTATACAATGGTGCAGAACAGAGGGTCCCAAGCCGCGAGGTG
GAGCCAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCG
GGTCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTAGGTAGCC

ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCA
ATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT
TGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGA

>D328

TGCAAGTCGAACGGCAGCGCGGGGCAACCCTGGTGGCAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCTCCTGGAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGAT
TAATACCGCATACGCTCTGTGGATGAAAGCGGGGATCTTTGACCTCGCGCTCAAGGGGCGGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA
CGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCCTG
ATCCAGCAATGCCCGGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAAACCTTCGTCTAATACGGTGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAG
CACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTGCAGCGGTTTCGTAGACCGATGTGAAT
CCCCGGCTTAACCTGGGACTGCATTGGTACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATAATCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGAAATACC
GATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGT
TGTCCGGTCTTATTGACTTGGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCG
GTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCTACCTTACATGTACGGAACCTTGTGAGAGGTGAGGGTCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTG
CTGCATGGCTGTCTGAGCTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGT
ACAAAACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAG
CCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGG
GTCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGA

>D335

TGCAGGCGCAGCAGGGTGTTCACCTGGTGGCAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATAC
CGCATACGATCTTTGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCA
GTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTATCGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCCTGATCCA
GCAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAAACCTTATGATCCTAATACGGTGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTGCAGAGCGGTTTGTAGACCGATGTGAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATAATCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGAAATACCGATG
GCGAAGGCAGCCCCCTGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTT
GGGATTATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA
TGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCTACCTTACATGGTGGAAATCCTGCTGAGAGGCGGGAGTGTCTGAAAGAGAACCATACACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTGAGCTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATC
CCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGT
ACACACCGCCCGCTCACACCATGGGAGTGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGA

>D336

TGCAACGGCAGCAGGGTGTTCACCTGGTGGCAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATA
CCGCATACGATCTTTGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATC
AGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCCTGATCCA
GCAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAAACCTTATGATCCTAATACGGTGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTGCAGAGCGGTTTGTAGACCGATGTGAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATAATCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGAAATACCGATG
GCGAAGGCAGCCCCCTGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTT
GGGATTATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA
TGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCTACCTTACATGGTGGAAATCCTGCTGAGAGGCGGGAGTGTCTGAAAGAGAACCATACACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTGAGCTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAAT
CCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTG
TACACACCGCCCGCTCACACCATGGGAGTGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGA

>D409

TGCAACGGCAGCAGGGGGCAACCCTGGTGGCAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCTCCTGGAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATAC
CGCATACGCTCTGAGAGGAAAGCGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTCAAGGGGCGGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATC
TGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGCAAGCCCTGATCCA
GCAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAAACCTTGGGTTAATACCCCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACC

CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTGATGTAAGACCGATGTGAAATCCC
CGGGCTTAACTGGGAACTGCATTGGTGACTGCATCGCTCAGATATGGCAGAGGGGGTGAAGTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
GGGGAAGGCAGCCCTGGTCAACTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCAACTGGTGTG
CGGGCTTCACTGGCTTGGTAACGTAGTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG
GATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAATCTGCTGAGAGGTGGGAGTGCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTG
CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCCAGGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCC
AATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGTC
TTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGA

>D411

TCGAACGGCAGCAGCGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGATTAATA
CCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGCCCTCGCGCTATAGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATC
AGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGATTGAGACACGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAAATGGCCGAAAGCCTGATCCA
GCAATGCCGCGTGTGGAAGAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTGGCCCTAATACGGTTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTCTAAGACCGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAAGTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
CGGAAGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCAACTAGTTGTT
GGGGATTCACTTCTTAGTAACGTAGTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA
TGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTGGGAATCCCGCTGAGAGGTGGGAGTGTCTGAAAGAGAACCAGCGCACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCAGCGAGGGGGAGCTAATC
CCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGTCTGT
ACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAG

>D416

TCGAACGGCAGCAGCGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTWATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGATTAATA
CCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGCCCTCGCGCTATAGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATC
AGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAAATGGCCGAAAGCCTGATCCA
GCAATGCCGCGTGTGGAAGAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTGGGCTCTAATACAGTTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTCTAAGACCGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAAGTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
CGGAAGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCAACTAGTTGTT
GGGGATTCACTTCTTAGTAACGTAGTAACGCGTGAAGTTTACCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA
TGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTGGGAATCCCGCTGAGAGGTGGGAGTGTCTGAAAGAGAACCAGCGCACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCAGCGAGGGGGAGCTAAT
CCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGTCTTG
TACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGG

>D422

CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGGAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGATTAATACCGCATAACGATCTCTGGATGAAAGCGGGGAC
GAAAGGCCTCGCGTCAAGGGCGGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTAAGAAAGCCCTTCGGG
TTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAACCGCTTCTCTAATACAGGGGTGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATAC
GTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACTGGGAACTGCATTGGTGACTGG
CGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAAGTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACG
CTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCAACTAGTTGTCGGGTCTTATTGACTTGGTAACGAAAGCTAACG
CGTGAAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAA
CCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAACCTTCCCGAGAGGTGAGGGTGCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTT
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGGCCGGTACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCC
TCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCA
GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGT
GGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGG

>D424

TCGAACGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCTGGAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACC
GCATACGCTCTATGGAGGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCTCAAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCT
GTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAG
CAATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCTGGGTTAATACCCGGGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACC
GGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTCAACGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTCGTTAAGACAGATGTGAAATCCCC
GGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGTACTGGCGGACTCGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGCTGAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
GCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTC
GGGTCTTACTGACTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAAAAGCGGTGG
ATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGTCCCCGAAAGGFAGCCATAACACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTGACTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAATCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCCAGGAGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGCTCATACAATGGTCCGGAACAGAGGGTGCACCAACCCCGAGGGGGAGCCAAT
CCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTT
GTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGG

>D425

GGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCTGGAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTCTGGATGAAAGCGGGGA
CCGAAAGCCCTCGCGCTCAAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCAC
ACTGGGACTGAAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCGCTTCTCTAATACAGAGGGTGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTA
ATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTCGTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTGGTGA
CTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACT
GACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTCGGGTCTTACTGACTTGGTAACGAAGCT
AACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAACGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCG
AAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAACCTTGCCGAGAGGTGAGGGTCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGCACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGCTCATACAATGGTCCGGAACAGAGGGTGCACCAAGCCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGAT
CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGG
AGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGG

>D433

TCGGACGGCAGCGCGGGGGCAACCCCTGGCGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCTGGAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATAC
CGCATACGCTCTATGGAGGAAAGCGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTCAAGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATC
TGTAGCTGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCCCTGATCCA
GCAATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACCTCCGCTCTAATACGGTGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCAC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCAACGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTCGTAAGACCGATGTGAAATCCC
CGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTGGTACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAATTCACGCTGAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
GGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTG
CGGGTCTTACTGACTTGGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAACGCGGTG
GATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGTCCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTG
CATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTACACGCTCATACAATGGTCCGGAACAGAGGGTGCACCAAGCCGAGGTGGAGCCA
ATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT
TGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGG

Anexo II (Medio LB adicionado con ácido succínico)

- Peptona de caseína 10 g/L
- Extracto de levadura 5 g/L
- Ácido Succínico 0.5 g/L

Anexo III (Super Buffer 50X)(Zhang y col., 2011)

- Na OH 20g/L
- H₃BO₃ 112.5g/L