



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Orientación: Bioquímica Clínica

**“Utilización de la secuencia parcial del gene de actina
(act) para diferenciar aislados de *Aspergillus* spp.
obtenidos de ambientes intrahospitalarios”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DÍAZ LOMELÍ PAULETTE GUADALUPE

DIRECTORA: DRA. ESPERANZA DUARTE ESCALANTE

ASESORA: MTRA. YOLANDA FLORES CABRERA

MÉXICO D.F. a 28 de Septiembre del 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Facultad de Medicina



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Molecular, Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM; bajo la dirección de la Dra. Esperanza Duarte Escalante. El proyecto fue financiado por el programa PAPPIT-DGAPA (IN219212), UNAM.

Agradecimientos

A la unidad de Micología Molecular de la Facultad de Medicina UNAM por abrirme las puertas y permitirme realizar el proyecto con ustedes, especialmente.

Dra. Esperanza Duarte Escalante, por ser una gran directora de tesis, por el apoyo incondicional que me brindó durante el desarrollo de la tesis, por el esfuerzo, dedicación, tiempo, paciencia y tolerancia en todo momento, y por la impartición de grandes conocimientos.

Dra. Rocío Reyes Montes, agradecerle por la confianza depositada en mi, por el apoyo, asesorías brindadas y sobre todo la facilidad que me dio para la realización de este proyecto.

Dra. María Guadalupe Frías De León por las asesorías y correcciones realizadas en la tesis.

M. en C. Erick Obed Martínez Herrera y próximamente Dr., que te puedo decir que no te haya dicho, gracias por el apoyo, comprensión y amistad brindada durante este tiempo.

M. en C. Emmanuel Rosas de la Paz por el apoyo en el análisis bioinformático.

a mi asesora **Mtra. Yolanda Flores Cabrera**, a mis sinodales, **Dra. Lourdes Navarrete Vega, Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez y M. en C. Araceli García** del Valle; por su valioso tiempo, apoyo, correcciones, gracias por sus grandes aprendizajes no solo en mi proyecto si no a lo largo de mis estudios.

A la **M en C. Hortensia Navarro Barranco** por su amistad brindada durante mis horas en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio **Bruno Cuapio y Gabriel Palma** por su apoyo, colaboración, consejos, y su gran amistad.

A mi familia **Lomelí**; a mis tíos **Roberto, Ericka, Arturo, Norma y Guadalupe**, porque siempre estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos dándome sus consejos y apoyo pero sobre todo sus palabras de aliento para nunca dejarme caer.

A mis padrinos **Alejandra y Enrique** por todo lo que me han enseñado, comprendido, apoyado, brindándome compañía y cariño, gracias por dejarme ser parte de su familia haciéndome sentir un integrante más, los quiero mucho.

Dedicatoria

Mi tesis la dedico con todo mi cariño y amor

A las dos personas que más amo en la vida a mi madre **Rebeca Lomelí Limón** por el cariño, apoyo moral y económico que siempre recibí, Con paciencia has forjado en mi sueños, ilusiones y esperanzas me has hecho crecer como persona ayudándome a salir adelante en momentos difíciles, por ser la mamá más mala y maravillosa de este mundo y a mi abuela que más que eso es mi madre **Aurora Limón Tapia** por todas las noches de desvelo cuando hacía mis tareas de la carrera con tu compañía todo era más fácil. Gracias a las dos por todo su amor, comprensión, trabajo, sacrificios, regaños y consejos, porque gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí, siempre han estado conmigo en todo momento y darme la herencia más valiosa que pudiera recibir mi carrera profesional.

A mi hermana **Karen Adriana** por el amor que le tengo, por tu apoyo y siempre estar a mi lado.

A mi pequeño travieso **Axel Yael** a quien, con el corazón lleno de tristeza, tuve que robarle horas de convivencia cuidados y juegos para poder culminar mi carrera, y a su corta edad no pudiera entender porque prefería estar enfrente de la computadora y no a su lado. Porque desde que estabas en mi vientre fuiste mi motor para seguir luchando, mi mayor ilusión, mi fuerza, mi alegría y mi razón de vivir.

A mi Esposo **Miguel Angel** por su apoyo constante y el amor incondicional, por ser mi amigo y compañero inseparable por tus palabras y consejos, así como con tu compañía enriqueciste esta etapa difícil de mi vida de esposa y estudiante, brindándome el tiempo necesario para realizarme profesionalmente y terminar nuestra meta fijada.

Y finalmente, para todas aquellas personas que dudaron que lo lograría y todas aquellas personas que en algún momento de una u otra manera han contribuido para la realización de este trabajo.

GRACIAS

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	7
GENERALIDADES.....	8
IMPORTANCIA CLINICA DE LA ASPERGILOSIS.....	9
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS PRINCIPALES ESPECIES PATÓGENAS DE <i>Aspergillus</i>	14
TAXONOMIA	17
IMPORTANCIA DE LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>Aspergillus</i>	19
PATOGENIA.....	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MATERIAL Y MÉTODO	27
AISLADOS DE <i>Aspergillus</i>	28
OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS.....	30
PRESERVACIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS	30
OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO	31
PCR UTILIZANDO LA SECUENCIA PARCIAL DEL GENE DE ACTINA	33
PURIFICACIÓN DE AMPLICONES OBTENIDOS DE PCR	34
SECUENCIACIÓN	35
ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS	35
ANÁLISIS FILOGENETICO	36
ANÁLISIS DE BOOTSTRAP	36

RESULTADOS	37
OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS Y PRESERVACION DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS	38
OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO	39
NORMALIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA PARCIAL DEL GENE DE ACTINA	44
PURIFICACIÓN DE LOS AMPLICONES OBTENIDOS DE LA PCR	53
EDICION Y COMPARACION DE SECUENCIAS	61
ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS	77
ELECCIÓN DEL MEJOR MODELO EVOLUTIVO	78
MÁXIMA VEROSIMILITUD.....	78
MÁXIMA PARSIMONIA	81
INFERENCIA BAYESIANA	83
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	85
CONCLUSIONES	90
PROPUESTAS	92
REFERENCIAS	94

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Morfología colonial de las especies del género <i>Aspergillus</i>	16
CUADRO 2. Clasificación del género <i>Aspergillus</i> , según Gams et al.	17
CUADRO 3. Aislados de <i>Aspergillus spp.</i> obtenidos de ambientes intrahospitalarios, en dos hospitales de la Ciudad de México	28
CUADRO 4. Secuencias de referencia	30
CUADRO 5. Cuantificación de DNA por espectrofotometría	43
CUADRO 6. Secuencias en formato FASTA de todos los aislados incluidos en el estudio.....	63
CUADRO 7. Comparación de las secuencias utilizando el algoritmo BLAST	76
CUADRO 8. Suma de pares y mínima entropía	78

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Cultivos monospóricos de <i>Aspergillus</i> spp. conservados en medio agar Sabouraud a 4 °C	38
FIGURA 2. Cultivos monospóricos de <i>Aspergillus</i> spp. preservados en agua a 4 °C.....	39
FIGURA 3. Cuantificación de DNA obtenidos de diferentes aislados de <i>Aspergillus</i> spp.	40
FIGURA 4. Cuantificación de DNA obtenidos de diferentes aislados de <i>Aspergillus</i> spp.	42
FIGURA 5. Temperatura de alineamiento a 55 °C.....	45
FIGURA 6. Temperatura de alineamiento a 56 °C	45
FIGURA 7. Temperatura de alineamiento a 57 °C	46
FIGURA 8. Temperatura de alineamiento a 58 °C	46
FIGURA 9. Temperatura de alineamiento a 59 °C	47
FIGURA 10. Curva de concentración de MgCl ₂	47
FIGURA 11. Curva de concentración de DNA.....	48
FIGURA 12. PCR con el gene de actina de DNA de todos los aislados de <i>Aspergillus</i> spp.....	50
FIGURA 13. PCR con el gene de actina de DNA de todos los aislados de <i>Aspergillus</i> spp.....	52
FIGURA 14. PCR con el gene de actina para obtener amplicones para ser purificados	54
FIGURA 15. PCR con el gene de actina para obtener amplicones para ser purificados	56
FIGURA 16. Amplicones obtenidos con el gene de actina de los productos purificados	58
FIGURA 17. Amplicones obtenidos con el gene de actina de los productos purificados	60
FIGURA 18. Ejemplo de un electroferograma, correspondiente al amplicon secuenciado con el gene de actina del aislado 9ACV	62
FIGURA 19. Árbol filogenético construido por el método de máxima verosimilitud	80
FIGURA 20. Árbol filogenético construido por el método de máxima parsimonia	82
FIGURA 21 Árbol filogenético construido por el método de inferencia bayesiana	84

RESUMEN

La Aspergilosis Invasora (AI) en los hospitales, es una de las enfermedades más graves entre los pacientes inmunodeprimidos, y la mayoría de estas infecciones son causadas por varias especies del género *Aspergillus*. En México, no existen datos epidemiológicos fidedignos que permitan conocer la frecuencia de agentes causales de la AI, y el objetivo del presente trabajo fue identificar aislados de *Aspergillus* spp., obtenidos de ambientes intrahospitalarios en la ciudad de México.

Se utilizaron 89 aislados de *Aspergillus* spp., previamente identificados, a nivel de género y/o especie y se obtuvieron cultivos monospóricos. De cada uno de éstos, se obtuvo DNA y se cuantificó para llevar a cabo la PCR, utilizando la secuencia parcial del gene de actina. Los amplicones obtenidos fueron purificados, secuenciados, editados y analizados con el algoritmo BLAST. Se realizaron y evaluaron alineamientos múltiples y se eligió el mejor modelo evolutivo. Para el análisis filogenético se emplearon los métodos de máxima verosimilitud (MEGA 6.0), máxima parsimonia (TNT) e inferencia bayesiana (MrBayes v.3.1.2). Se empleó un análisis de bootstrap para estimar el apoyo de las ramas en los árboles construidos por máxima verosimilitud y máxima parsimonia. Para el árbol construido por inferencia bayesiana las probabilidades posteriores fueron utilizadas para estimar la confiabilidad de la topología.

Las secuencias analizadas a través del algoritmo BLAST, mostraron que en 69 aislados, hubo correlación entre su identidad fenotípica y su identidad molecular a nivel de especie, mientras que 20 aislados sólo mostraron esta correlación a nivel de Sección. El análisis filogenético de los aislados estudiados, mostró gran concordancia entre los tres métodos utilizados, en los cuales se observó la misma topología en los árboles obtenidos.

De esta manera, la secuencia parcial del gene de actina, mostró ser una herramienta de apoyo para la identificación de especies del género *Aspergillus*, ya que aislados identificados fenotípicamente como *Aspergillus* spp; fueron ubicados en las especies *A. calidoustus*, *A. niger* y *A. flavus*.

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Aspergillus* son saprobias, ubicuas en el ambiente y desarrollan cientos de estructuras de reproducción asexual (conidios), las cuales son fácilmente transportadas por el viento, como resultado, los humanos se encuentran expuestos; de manera continua, a cientos de estos conidios. En huéspedes sanos, los conidios inhalados, se eliminan con éxito por los mecanismos de defensa mucociliar epiteliales y por los fagocitos residentes. Sin embargo en individuos con funciones pulmonares alteradas tales como el asma y la fibrosis quística, puede causar la aspergilosis broncopulmonar alérgica, una respuesta hipersensible a componentes de hongos. Otra presentación clínica es el aspergiloma, que puede desarrollarse después de la exposición a los conidios en cavidades pulmonares preexistentes como lesiones pasadas en pacientes con tuberculosis. La aspergilosis invasiva (AI), es una enfermedad relacionada frecuentemente con pacientes severamente inmunocomprometidos, entre los cuales se encuentran personas con neoplasias hematológicas (por ejemplo, leucemia), pacientes con trasplante de órganos sólidos y de células madre hematopoyéticas, pacientes con tratamiento prolongado con corticoides y pacientes con inmunodeficiencias genéticas (como la enfermedad granulomatosa crónica). El factor predisponente más importante es un defecto cuantitativo o cualitativo de los neutrófilos, pero el creciente número de AI en pacientes inmunocomprometidos sin neutropenia, subraya la importancia de factores relacionados con la defensa de células no-neutrófilos. Estos mecanismos pueden incluir el reconocimiento del microorganismo, el reclutamiento de leucocitos

distintos de los neutrófilos y los mecanismos efectores de células residentes reclutadas. En general, las tasas de mortalidad varían de 40 a 90% en poblaciones de alto riesgo y dependen de factores tales como el estado inmune del huésped, el sitio de la infección y el régimen de tratamiento aplicado¹.

Las especies del género *Aspergillus* son la causa más frecuente de infecciones invasoras en pacientes inmunocomprometidos. La especie más común causante de AI es *A. fumigatus*^{2,3} perteneciente a la Sección *Fumigati*, sin embargo, de manera importante, recientemente se han reportado otras especies asociadas a esta patología.^{4,5} Asimismo, el trabajo de Barton⁶ sugiere otras especies, todas pertenecientes a la Sección *Fumigati*, como causantes de AI.

En México, no existen datos epidemiológicos fidedignos que nos permitan conocer la frecuencia de los agentes causales de la AI, por lo que el objetivo del presente trabajo fue identificar aislados de *Aspergillus* spp., obtenidos de ambientes intrahospitalarios en la ciudad de México, a través de la secuencia parcial del gene de actina. Estos aislados fueron previamente identificados a nivel de género y/o especie, por métodos de macro y micromorfología, un procedimiento rutinario en la mayoría de los laboratorios de Micología para realizar el diagnóstico de la aspergilosis. Sin embargo, este procedimiento no permite la identificación certera de especies diferentes pero morfológicamente y filogenéticamente similares. Así que, dada la diversidad de especies del género *Aspergillus*, los métodos moleculares han resultado favorables para una identificación correcta de las especies⁷, por lo que la utilización del gene de actina para este fin, nos permitirá determinar las especies presentes en ambientes hospitalarios, e identificarlas a

través de una comparación molecular entre las secuencias del gene de actina obtenidas y las secuencias de referencia, así como su probable papel en las infecciones nosocomiales.

MARCO TEÓRICO

Generalidades

Se ha denominado aspergilosis a los distintos síndromes clínicos producidos por hongos del género *Aspergillus*, término que fue descrito por primera vez en 1729 por Pier Antonio Micheli, quién evidenció que la cabeza conidial de estos hongos tenían similitud con un "aspergillum" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita).

La primera descripción de una patología provocada por *Aspergillus*, la hicieron Meyer y Emmert en 1815, quiénes descubrieron la enfermedad pulmonar; en 1847, Theodor Sluyter publica el primer caso de aspergilosis pulmonar; en 1850, J.B. Georg W. Fresenius, describe la infección en una ave, y la denomina "aspergilosis", causada por *Aspergillus fumigatus*; Rudolph Virchow en 1856, reportó cuatro casos de aspergilosis broncopulmonar, en ese mismo año Sebastian Rivolta describió la enfermedad en caballos; en 1902, Ceni y Besta, señalaron la existencia de metabolitos de *A. fumigatus* y *A. flavescens*, tóxicos para animales; y en 1939, Link publicó el primer caso diseminado de aspergilosis con lesiones en el SNC. En México, Antonio Gonzáles Ochoa en 1951, comunicó el primer caso de aspergilosis en un paciente con infección pulmonar⁸.

Los miembros del género *Aspergillus*, son hongos filamentosos hialinos, ubicuos en la naturaleza y de distribución universal, ya que se ha aislado prácticamente de cualquier sustrato, están presentes en el suelo, aire, plantas y materia orgánica en descomposición. El polvo de las casas es un nicho ecológico muy adecuado, así como los alimentos, de manera que dada su ubicuidad, se ha demostrado que

existen altas concentraciones de conidios del hongo, tanto en ambientes exteriores, como en ambientes interiores. Los hongos del género *Aspergillus*, son productores de enfermedades de distribución universal, que ocasionalmente pueden aparecer en forma de brotes hospitalarios tras obras de remodelación debido a la concentración de conidios de *Aspergillus* o por la conducción de aire contaminado. Por otro lado, se ha mostrado que algunas especies del género *Aspergillus* también forman parte de la microbiota normal orofaríngea, de fosas nasales, tegumentos y del tubo gastrointestinal^{9,10}.

Importancia Clínica de la Aspergilosis

Las patologías causadas por *Aspergillus* son muy diversas e incluyen, micotoxicosis, reacciones alérgicas, colonización e invasión en individuos inmunocompetentes y enfermedad sistémica con altas tasas de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, denominada aspergilosis invasora¹¹.

Aspergilosis Bronco-Pulmonar-Alérgica (ABPA)

Las especies causantes de ABPA, más comúnmente aisladas en ambientes cerrados, pertenecen al género *Aspergillus*, contrario a lo que sucede en ambientes exteriores. La concentración de conidios de estos hongos en el ambiente aporta una significativa carga antigénica a la que un individuo puede estar expuesto, y siendo éste, atópico o hipersensible, se observa una respuesta inmune exacerbada.

La aspergilosis alérgica es una enfermedad en donde el individuo susceptible no muestra reacción inflamatoria y se presenta por exposiciones repetidas a los

antígenos o a los conidios, pero en ausencia de invasión de micelio en el tejido pulmonar, y cuyos síntomas disminuyen con la administración de corticoides, el síndrome es definido por bronquiectasias, asma, infiltrados pulmonares, reacción cutánea (+) a los antígenos aspergilaes y presencia de tapones. Se presenta en el 20% de los pacientes alérgicos y en el 5-10% de pacientes con fibrosis quística. El esputo presenta aspecto sanguinolento y gelatinoso. Las imágenes radiográficas muestran infiltrados o sombras, y un tipo migratorio de neumonía. Los cambios radiográficos son característicos de la enfermedad.

Latgé ¹ (1999) define los siguientes criterios como necesarios para el diagnóstico de ABPA: asma, eosinofilia periférica (mayor a 1000/mm³), reactividad cutánea a los extractos de *A. fumigatus*, elevados niveles séricos de IgE e historia de infiltrados pulmonares. El paciente puede expectorar tapones mucosos que incluyen filamentos, cristales de Charcot-Layden y eosinófilos. Por otro lado, se considera que el asma, las reacciones cutáneas positivas para antígenos aspergilaes, los infiltrados pulmonares, la eosinofilia periférica y consecuentemente el aumento de IgE, así como la presencia de Ac tipo precipitinas y los cultivos positivos, son parámetros suficientes para llegar al diagnóstico de ABPA.¹²

Aspergilomas

Es una patología que involucra cavidades preformadas, ya sea por tuberculosis (TBC) o por sarcoidosis, donde se alojan masas proteicas que incluyen desarrollo saprofitico de formas fúngicas semejantes a micetomas, lo que le da el aspecto de bola, pero sin invadir paredes u otros tejidos. Frecuentemente se presenta con

hemoptisis, debido a la liberación de enzimas proteolíticas y a la fricción mecánica que provocan las masas fúngicas.

El aspergiloma puede ser el resultado de ABPA al alojarse en un bronquio ectático; clínicamente se manifiesta igual que la ABPA pero se caracteriza por hemoptisis severa. En el estudio inmunológico de estos pacientes se observan títulos de IgE e IgG, y reacciones cutáneas (+).

Es importante señalar que Kac *et al.*¹³, realizaron un estudio retrospectivo de las aspergilosis en un hospital de París, y observaron que los aspergilomas se encuentra en franco descenso a lo largo del tiempo, ya que en 1981 representaban el 65% de la patología aspergilar y en 1992 descendió hasta el 20%, además la edad promedio de presentación es entre 50 y 60 años. Otras localizaciones extrapulmonares de estas “bolas fúngicas” son los senos paranasales y la vejiga.

Aspergilosis invasora (AI)

La AI es una entidad clínica que ha tomado importancia en años recientes, las formas clínicas locales más frecuentes de AI tienen lugar a nivel pulmonar y en senos paranasales, aunque también pueden afectar el tracto gastrointestinal o la piel, por inoculación directa¹².

El hecho de contraer esta enfermedad depende de la susceptibilidad del huésped, principalmente en aquellos que poseen una marcada neutropenia o neutrófilos con funcionalidad deficiente, por lo tanto los individuos más susceptibles son los pacientes con enfermedades neoplásicas, granulocitopenia y sometidos a corticoterapia. Se han realizado estudios para investigar el aumento de la habilidad invasora de *A. fumigatus* y *A. flavus* en pacientes con síndrome de

Cushing y/o con corticoterapia prolongada, pudiendo asociarse con la alteración de la capacidad fagocítica de los macrófagos y a la disfunción de los neutrófilos, sumado al estímulo que le provee la hidrocortisona (*in vitro*). En pacientes HIV (+) se presenta conjuntamente con otra patología del árbol bronquial o con una función defectuosa de los neutrófilos, provocando una invasividad exacerbada, aunque la asociación de HIV con la AI es controvertida.

La AI puede cursar con una sintomatología inespecífica. La clásica triada descrita en pacientes neutropénicos asocia: fiebre, dolor pleurítico y hemoptisis. No obstante, en cualquier paciente con factores de riesgo, la presencia de síntomas respiratorios junto a la presencia de nódulos o infiltrados pulmonares debe sugerir una aspergilosis pulmonar. En estos pacientes, los hallazgos iniciales suelen incluir nódulos con un contorno atenuado a su alrededor (signo del halo), que refleja hemorragia y edema circundante a la lesión.

La AI en los hospitales se ha convertido en una de las enfermedades más graves entre los pacientes inmunocomprometidos, particularmente en pacientes que se encuentran en las unidades de trasplante de médula ósea^{14,15} y la mayoría de estas infecciones son causadas por *A. fumigatus*, seguida de *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*. Aunque, en algunos países desarrollados, *A. terreus* predomina sobre *A. fumigatus*, ya que se observan con frecuencia casos de AI ocasionados por este hongo^{16,17}. En los últimos años, también se ha descrito un aumento en el número de casos de AI ocasionados por otras especies del género *Aspergillus*, como son *A. versicolor* Sección *Nidulantes*, *A. ustus* Sección *Usti*, *A. nidulans* Sección *Nidulantes* y *A. glaucus*⁵ Sección *Aspergillus*. Asimismo el trabajo de Barton⁶ sugiere, además de *A. fumigatus*, a *A. lentulus*, *A. novofumigatus* y *A.*

*fumigati*affinis, todos ellos pertenecientes a la Sección *Fumigati* y la especie teleomórfica *Neosartorya udagawae*, como causantes de AI.

Por otro lado, la ubicuidad de estas especies en la atmósfera pueden explicar los brotes de aspergilosis nosocomial, debido a la alta concentración de esporas en los ambientes intrahospitalarios, ocasionados por trabajos de construcción, o a los sistemas de ventilación deficientes o contaminación de agua^{18,19,20,21,22}. La aparición de estos brotes ha conducido al establecimiento de medidas profilácticas, como es el uso de filtros de aire de alta eficiencia para la captura de partículas, sin embargo, su uso solamente ha reducido el nivel de contaminación del aire del hospital y el riesgo de infección durante los trasplantes de médula ósea, pero no ha resuelto el problema de enfermedades tardías²³. Además, muchos casos de AI han ocurrido incluso bajo condiciones de flujo laminar. Como resultado, la AI sigue siendo la principal causa de mortalidad entre los pacientes trasplantados en el ámbito hospitalario^{24,25}. Esta falta de conocimiento acerca del reservorio del inóculo de infección ha motivado la implementación de estudios epidemiológicos con datos de tipificación genómica para investigar la naturaleza de las infecciones nosocomiales por *Aspergillus* y para identificar la fuente del inóculo²⁶.

Características Morfológicas de las Principales Especies Patógenas de *Aspergillus*



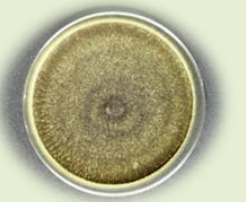
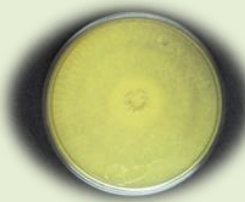


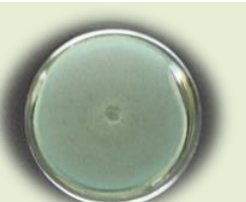
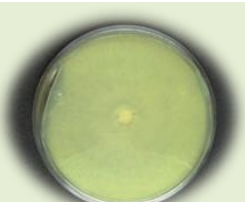

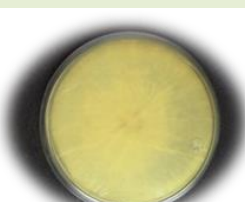

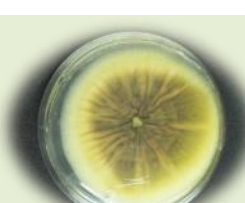
Tradicionalmente, la identificación de las especies de *Aspergillus* en los laboratorios de Microbiología clínica se apoya en el aislamiento del hongo y el registro de sus características a nivel macro y microscópico, ya que hasta antes de la utilización de las herramientas de diagnóstico molecular, sólo *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus* se reconocían fundamentalmente, como causantes de aspergilosis. Sin embargo, en los últimos años se han registrado nuevas especies del género *Aspergillus*, asociados con infecciones clínicas, lo que resulta de gran importancia ya que debe revalorarse la comprensión de la epidemiología, el diagnóstico de laboratorio y el tratamiento de las infecciones causadas por estos hongos.

Uno de los principales sistema de identificación para especies de *Aspergillus* es el propuesto por Klich y Pitt²⁷ (1988), quienes utilizan tres medios de cultivo y dos temperaturas de incubación, además sugieren que cada cepa debe sembrarse en dos cajas de medio de cultivo CYA (Agar Extracto de Levadura-Czapek) y una en MEA (Agar Extracto de Malta), una de las placas de CYA, adicionada con 20% de sacarosa, y la placa de MEA, se incuba a 37 °C y la restante a 25 °C. Tras siete días de incubación se procede a la observación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los cultivos. Las principales características macroscópicas consideradas son: diámetro de las colonias, coloración del anverso y del reverso de las colonias, presencia de esclerocios, presencia de gotas de exudado, presencia de pigmento difusible y textura de las colonias. Mientras que

las principales características microscópicas son: disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula, longitud y ancho de los estipes, forma y diámetro de las vesículas, longitud y ancho de las métulas y fiálides, forma, diámetro, ornamentación y color de los conidios, forma, tamaño y color de las células de Hülle y forma, tamaño y color de las ascosporas.

Asimismo, las características morfológicas coloniales de las principales especies patógenas para el hombre son: *A. fumigatus* presenta colonias son planas, ilimitadas, polvosas, aterciopeladas ó algonodosas, de color verde botella, blanco ó grisáceo y en ocasiones presentan un halo micelial blanco o rosa alrededor de la colonia, al reverso incoloro, rojo ó amarillento y raras veces se ve un pigmento de color ocre; *A. flavus* presenta colonias de aspecto pulverulento, son ilimitadas, polvosas o aterciopeladas, de color verde amarillento brillante; al reverso algunas cepas producen pigmento café ligeramente difusible, incoloro ó amarillento; *A. niger* presenta colonias planas, granulosa, punteado negro e ilimitadas; color blanco amarillento al reverso, generalmente no presentan pigmento, cuando lo producen es de color amarillento; *A. terreus* presenta colonias aterciopeladas ilimitada, pulverulenta, granulosa, de color beige-café ó marrón achocolatada con un halo micelial blanco, café ó sin pigmento al reverso⁸. El cuadro 1 muestra algunos ejemplos de la morfología colonial de las principales especies del género *Aspergillus*, que causan enfermedades en el hombre^{28,29}.

CUADRO 1. Morfología colonial de especies del género *Aspergillus*

AISLADO	ANVERSO	REVERSO
55DHJ <i>A. niger</i>		
88CHJ <i>A. niger</i>		
262AHJ <i>A. fumigatus</i>		
385BHJ <i>A. fumigatus</i>		
323CHJ <i>A. flavus</i>		
B17HJ <i>A. terreus</i>		

Taxonomía

La taxonomía de *Aspergillus* spp. y sus teleomorfos ha sufrido importantes cambios, principalmente durante los últimos años. Desde 1965, el texto por excelencia sobre el género ha sido "The genus *Aspergillus*" de Raper y Fennell³⁰ (1995), quiénes hasta ese momento, aceptaban 132 especies, subdivididas en 18 grupos. Sin embargo, Gams³¹ *et al.* (1985), reclasificaron el género y lo dividieron en 6 subgrupos, cada uno a su vez, subdividido en una o más secciones (cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación del género *Aspergillus*, según Gams *et al.* (1985)

Subgénero	Sección	Sinónimo ^b	Especie tipo	Teleomorfo
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	Grupo <i>A. glaucus</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>Eurotium</i>
	<i>Restricti</i>	Grupo <i>A. restrictus</i>	<i>A. restrictus</i>	--
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	Grupo <i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>Neosartorya</i>
	<i>Cervini</i>	Grupo <i>A. cervinus</i>	<i>A. cervinus</i>	--
<i>Ornati</i>		Grupo <i>A. ornatus</i>	<i>A. ornatus</i>	<i>Warcupiella, Sclerocleista, Hemicarpenales</i>
<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>	Grupo <i>A. clavatus</i>	<i>A. clavatus</i>	--
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	Grupo <i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>Emericella</i>
	<i>Versicolores</i>	Grupo <i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>	--
	<i>Usti</i>	Grupo <i>A. ustus</i>	<i>A. ustus</i>	--
	<i>Terrei</i>	Grupo <i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	--
	<i>Flavipedes</i>	Grupo <i>A. flavipes</i>	<i>A. flavipes</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Wentii</i>	Grupo <i>A. wentii</i>	<i>A. wentii</i>	--
	<i>Flavi</i>	Grupo <i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	--
	<i>Nigri</i>	Grupo <i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	--
	<i>Circumdati</i>	Grupo <i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Petromyces</i>
	<i>Candidi</i>	Grupo <i>A. candidus</i>	<i>A. candidus</i>	--
	<i>Cremeri</i>	Grupo <i>A. cremerus</i>	<i>A. cremerus</i>	<i>Chaetosartorya</i>
	<i>Sparsi</i>	Grupo <i>A. sparsus</i>	<i>A. sparsus</i>	--

a: adaptada de Gams *et al.* [12]

b: grupos establecidos por Raper y Fennell [6]

Samson³² *et al.* (36) 2007, reclasificaron el género *Aspergillus* en 25 diferentes especies, 8 anamorfos (*A. brevipes*, *A. duricaulis*, *A. fumigatus*, *A. fumigati*affinis, *A. lentulus*, *A. novofumigatus*, *A. unilateralis* y *A. viridinutans*) y 17 teleomorfos (*N. aurata*, *N. aureola*, *N. coreana*, *N. fennelliae*, *N. fischeri*, *N. glabra*, *N. lacinosa*, *N. spinosa*, *N. quadricincta*, *N. stramenia*, *N. spathulata*, *N. hiratsukae*, *N. pseudofischeri*, *N. tetenoi*, *N. multiplicata*, *N. udagawae* y *N. sublevispora*).

Por otro lado, Hong³³ *et al.* (2008), con base en un enfoque polifásico utilizando criterios morfológicos, producción de extrófitos y secuencias parciales de los genes de β -tubulina, calmodulina, y actina, proponen tres nuevas especies de *Neosartorya* (*N. denticulata*, *N. assulata* y *N. galapagensis*) y una nueva especie de *Aspergillus* de la sección *Fumigati* (*A. turcosus*), de manera que la reclasificación del género *Aspergillus* contempla hasta ese momento 39 especies diferentes, 29 teleomorfos y 10 anamorfos.

Krimitzas³⁴ *et al.* (2013), estudiaron aislados de diferentes especies de *Aspergillus* procedentes de Grecia y los examinaron utilizando criterios morfológicos y moleculares para explorar la diversidad de este género. La relación filogenética de estas especies se determinó utilizando secuencias de la región ITS, IGS y secuencias de los genes nucleares β -tubulina y *rpb2*, además de dos genes mitocondriales, *rns* y *cox1*. Además, esta relación filogenética fue inferida a través de neighbor joining, máxima parsimonia e inferencia bayesiana. Sus resultados mostraron siete clados bien apoyados dentro del género *Aspergillus* y consideraron ~250 especies agrupadas en 18 secciones y 6 subgrupos.

Un trabajo más reciente realizado por Samson³⁵ *et al.* (2014), con base en secuencias de ITS, calmodulina, β -tubulina y RPB2, además de secuencias disponibles en el GenBank, y considerando los cambios sugeridos en el Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas, de un nombre-una especie, y manteniendo a *Aspergillus* como género, en lugar de utilizar géneros más pequeños, considera para este género, 339 especies.

Importancia de la Identificación de Especies de *Aspergillus*

Los procedimientos para diferenciar especies únicas, resulta de gran importancia, por ejemplo, *A. fumigatus* Sección *Fumigati*, *A. flavus* Sección *Flavi*, *A. terreus* Sección *Terrei*, *A. ustus* Sección *Usti*, *A. lentulus* Sección *Fumigati*, *A. versicolor* Sección *Nidulantes* y *A. niger* Sección *Nigri*, han mostrado diferente potencial de virulencia y susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos³⁶.

Hasta el momento, no existe un método (morfológico, fisiológico o molecular) completamente eficaz en el reconocimiento de especies. Sin embargo, los marcadores moleculares diseñados con base en las secuencias de DNA variables, proporcionan los mejores medios para identificar, inferir relaciones y determinar variabilidad genética, entre los miembros del género *Aspergillus*^{37,38}.

Balajee *et al.*³⁹, examinaron la diversidad genética de aislados clínicos identificados previamente como *A. fumigatus* Sección *Fumigati*, a través de la técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Sus resultados mostraron la presencia de al menos tres especies distintas: *A. lentulus*, *A. udagawae* y *A. fumigatus*, todos pertenecientes a la Sección *Fumigati*, indicando que los métodos fenotípicos para identificar estos hongos, son insuficientes para

distinguir entre especies morfológicamente similares pero genéticamente distintas dentro de la Sección *Fumigati*. Además de evidenciar que la susceptibilidad diferencial a diversos antifúngicos por parte de estas especies, puede ser responsable de algunas fallas terapéuticas registradas en los pacientes.

Por otro lado, Hong *et al.*³³ utilizaron un enfoque polifásico, con base en la morfología, la producción de extrolitos y las secuencias parciales de los genes de β -tubulina, calmodulina y actina, para proponer tres nuevas especies de *Neosartorya* (*N. denticulata*, *N. assulata* y *N. galapagensis*) y una nueva especie de *Aspergillus* (*A. turcosus*).

Un trabajo desarrollado por Van *et al.*⁴⁰, dirigido para distinguir entre dos tipos de aislados (*A. fumigatus* var. *fumigatus* y *A. fumigatus* var. *ellipticus*), a través del análisis de restricción de un fragmento del gene *rodA* (que codifica para una hidrofobina) utilizando la enzima de restricción *Hin*I, reveló la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido en cinco posiciones de este fragmento, lo que permitió distinguir entre *A. fumigatus* var. *fumigatus* y su variante *ellipticus*.

Otras estrategias recientemente utilizadas para la identificación de especies de *Aspergillus*, son la amplificación y secuenciación de regiones ITS y de los genes de β -tubulina y calmodulina, reportadas por Tam *et al.*⁴¹.

De manera que, la aparición de nuevas especies en los últimos años, hace necesaria la identificación precisa de los hongos para establecer un diagnóstico y tratamiento eficaz⁴².

Patogenia

Los hongos del género *Aspergillus*, particularmente *A. fumigatus*, uno de los más importantes patógenos para el hombre, es un ejemplo de lo que se denomina "patógeno oportunista", es decir, suele afectar a pacientes con mecanismos de defensa comprometidos.

Los conidios de *A. fumigatus* que alcanzan los alvéolos pulmonares son incapaces de resistir la respuesta inmune de huéspedes inmunocompetentes porque el hongo carece de factores de virulencia especializados. Sin embargo, los pacientes que son sometidos a trasplantes de órganos, quimioterapia contra el cáncer, o tienen enfermedad granulomatosa crónica (EGC), como una condición subyacente, son altamente susceptibles a la infección por el hongo porque los conidios inhalados pueden adaptarse de manera eficiente a la fisiología alterada del entorno en el huésped. Esto indica que la habilidad de adaptación de *A. fumigatus* al medio ambiente humano, aunque exitosa, es secundaria al estado inmune del huésped. Los conidios inhalados germinan fácilmente a 37 °C, que es la temperatura corporal de mamíferos y la temperatura óptima tanto para la germinación como para el crecimiento del hongo. Durante este período de crecimiento inicial, *A. fumigatus* responde al estrés impuesto por el medio ambiente del huésped mediante la utilización de un programa de expresión génica altamente coordinado que permite la adaptación a la limitación de hierro, nitrógeno y escasez de glucosa, el estrés alcalino, y otras condiciones desfavorables. Todas estas características indican que *A. fumigatus* está equipado para crecer en una amplia gama de condiciones desfavorables en la naturaleza, por lo que el medio

ambiente de un huésped inmunocomprometido constituye otra condición adversa a la que el hongo puede adaptarse con éxito⁴³.

A. fumigatus, es el principal agente causal de la AI, la cual se ha incrementado en los últimos años. Este agente tiene características particulares que le hacen ser exitoso como patógeno. *A. fumigatus* cual se puede aislar a partir de una amplia variedad de sustratos durante todo el año, en la mayor parte del mundo. Aunque este hongo crece de manera óptima a 37 °C y en un rango de pH 3.7 a 7.6, puede ser aislado de materia orgánica en descomposición y en suelos donde las temperaturas oscilan entre 12° y 65 °C y el pH oscila entre 2.1- 8.8. Se ha demostrado que *A. fumigatus* es un hongo reciclador eficiente en la naturaleza, ya que posee un metabolismo versátil que le permite obtener sus requerimientos nutricionales en diferentes condiciones ambientales. La presencia de numerosas glicosilhidrolasas y proteinasas extracelulares en el genoma de *A. fumigatus* dan evidencia de la capacidad del hongo para degradar polisacáridos de las paredes celulares de plantas y adquirir fuentes de nitrógeno. La termotolerancia de *A. fumigatus* es aún más notable en las ascosporas, los propágulos producidos en el ciclo sexual. Las ascosporas de *A. fumigatus* están protegidas por una pared extraordinariamente gruesa en comparación con otros *Aspergillus*, tales como *A. nidulans*. Estas estructuras germinan aún después de calentarlas a 70 °C, durante 30 minutos y pueden sobrevivir en estas condiciones. Aunque *A. fumigatus* no logra crecer a temperaturas por debajo de 12 °C, sus conidios pueden tolerar tensiones impuestas por congelación durante períodos prolongados. Dependiendo de la cepa, los conidios del hongo pueden sobrevivir en nitrógeno líquido durante

un máximo de 18 años. Los conidios de *A. fumigatus* también puede tolerar la deshidratación durante períodos prolongados, sobreviviendo por más de 60 años. La amplia distribución de *A. fumigatus* en la naturaleza también puede ser explicada por la presencia de sistemas de defensa exitosos tales como la producción de metabolitos secundarios potentes y bombas de eflujo. El genoma de *A. fumigatus* contiene 22 grupos de genes del metabolismo secundario y 16 de estos metabolitos se han identificado, incluyendo la gliotoxina. El genoma de *A. fumigatus* también es abundante en enzimas específicas tales como las catalasas, superóxido dismutasa y glutatión transferasas para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Todas estas características, le permiten al hongo sobrevivir y propagarse en condiciones que son perjudiciales para una amplia gama de otros organismos ambientales, haciéndolo exitoso en la naturaleza.

A pesar de la importancia demostrada de la aspergilosis, fundamentalmente en huéspedes inmunocomprometidos, en México no existen datos epidemiológicos fidedignos que nos permitan conocer la frecuencia de estos hongos en ambientes intrahospitalarios, dada la ubicuidad de éstos en el ambiente, ni el número de casos de AI causados por diferentes especies de *Aspergillus*, lo que es de suma importancia ya que como se ha descrito anteriormente, durante los últimos años han aparecido nuevas especies responsables de AI, lo que ha motivado la implementación de estudios epidemiológicos con datos de tipificación genómica para investigar la naturaleza de las infecciones nosocomiales por *Aspergillus*. De manera que el objetivo del presente trabajo fue utilizar la secuencia parcial del

gene de actina para identificar aislados de *Aspergillus* spp. obtenidos del ambiente de dos hospitales de la ciudad de México.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de la escasa información existente sobre la epidemiología de la AI en nuestro país, como se ha mencionado anteriormente, los datos no oficiales sugieren que la frecuencia de esta micosis ha ido en aumento, debido entre otras cosas, a la ubicuidad del hongo en la naturaleza y al aumento de pacientes inmunocomprometidos, en donde las poblaciones de *Aspergillus* spp. que se encuentran en el ambiente son un factor de riesgo para contraer la enfermedad.

En México, no se han llevado a cabo estudios en hospitales para conocer con qué frecuencia se encuentra *Aspergillus* spp. en el ambiente, ni tampoco se ha llevado a cabo un trabajo que permita distinguir a nivel molecular entre aislados del género *Aspergillus*, por lo que este trabajo representa una aportación a la epidemiología molecular del género *Aspergillus* en México.

HIPÓTESIS

Si es posible amplificar la secuencia parcial del gene de actina, a partir de DNA obtenido de aislados de *Aspergillus* spp, entonces será posible discriminarlos a nivel de especie.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar aislados de *Aspergillus* spp. obtenidos en ambientes intrahospitalarios utilizando la secuencia parcial del gene de actina.

Objetivos particulares

1. Obtener cultivos monospóricos de *Aspergillus* spp. obtenidos en ambientes intrahospitalarios.
2. Obtener DNA genómico de los cultivos monospóricos de *Aspergillus* spp. obtenidos en ambientes intrahospitalarios.
3. Normalizar las condiciones de reacción para la amplificación de la secuencia del gene de actina.
4. Realizar la PCR con todos los aislados incluidos en el estudio.
5. Purificar los amplicones obtenidos en la PCR de todos los aislados de *Aspergillus* spp.
6. Obtener las secuencias de los amplicones obtenidos con el gene de actina.
7. Analizar las secuencias obtenidas y ubicar los aislados en las diferentes Secciones por inferencia filogenética

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislados de *Aspergillus* spp. Se utilizaron 89 aislados de *Aspergillus* spp., obtenidos de ambientes de dos hospitales de la ciudad de México, el Hospital Juárez de México y el Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana”, previamente identificados a nivel de género y/o especie, a través de sus características micro y macromorfológicas (Cuadro 1).

Cuadro 3. Aislados de *Aspergillus* spp. obtenidos de ambientes en dos hospitales de la Ciudad de México

Hospital Juárez de México		Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana	
Número de aislado	Especie y/o género	Número de aislado	Especie y/o género
385BHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	233ACV	<i>Aspergillus fumigatus</i>
B18HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	A36CV	<i>Aspergillus fumigatus</i>
B11HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	A35CV	<i>Aspergillus fumigatus</i>
B23HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	A10CV	<i>Aspergillus fumigatus</i>
411AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	235ACV	<i>Aspergillus fumigatus</i>
B43HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	257CCV	<i>Aspergillus fumigatus</i>
392AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	176ACV	<i>Aspergillus fumigatus</i>
B21HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	9ACV	<i>Aspergillus fumigatus</i>
100AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	222ACV	<i>Aspergillus fumigatus</i>
435AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	A28CV	<i>Aspergillus fumigatus</i>
270BHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	202BCV	<i>Aspergillus niger</i>
B4HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	281CCV	<i>Aspergillus niger</i>
262AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	284BCV	<i>Aspergillus niger</i>
394AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	217ACV	<i>Aspergillus niger</i>
B20HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	243ACV	<i>Aspergillus niger</i>
373CHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	103BCV	<i>Aspergillus niger</i>
312BHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	220ACV	<i>Aspergillus niger</i>
314AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	314BCV	<i>Aspergillus niger</i>
387AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	A13CV	<i>Aspergillus niger</i>
412AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	166ACV	<i>Aspergillus niger</i>
395AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	381DCV	<i>Aspergillus niger</i>
50CHJ	<i>Aspergillus niger</i>	A26CV	<i>Aspergillus niger</i>
264AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	219ACV	<i>Aspergillus niger</i>
140AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	31ECV	<i>Aspergillus niger</i>

B25HJ	<i>Aspergillus niger</i>	A25CV	<i>Aspergillus niger</i>
250AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	307ACV	<i>Aspergillus niger</i>
B49HJ	<i>Aspergillus niger</i>	2ACV	<i>Aspergillus niger</i>
87BHJ	<i>Aspergillus niger</i>	88CCV	<i>Aspergillus niger</i>
B27HJ	<i>Aspergillus niger</i>	A39CV	<i>Aspergillus niger</i>
B13HJ	<i>Aspergillus niger</i>	335BCV	<i>Aspergillus niger</i>
146AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	87ACV	<i>Aspergillus flavus</i>
88CHJ	<i>Aspergillus niger</i>	24CCV	<i>Aspergillus niger</i>
373AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	27DCV	<i>Aspergillus flavus</i>
B34HJ	<i>Aspergillus niger</i>	24DCV	<i>Aspergillus flavus</i>
B39HJ	<i>Aspergillus niger</i>	A38CV	<i>Aspergillus flavus</i>
B52HJ	<i>Aspergillus niger</i>	24BCV	<i>Aspergillus flavus</i>
55DHJ	<i>Aspergillus niger</i>	A17CV	<i>Aspergillus flavus</i>
B12HJ	<i>Aspergillus niger</i>	A40CV	<i>Aspergillus flavus</i>
360BHJ	<i>Aspergillus niger</i>	A15CV	<i>Aspergillus flavus</i>
316AHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	237CCV	<i>Aspergillus terreus</i>
312AHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	343BCV	<i>Aspergillus</i> spp.
55CHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	237BCV	<i>Aspergillus</i> spp.
323CHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	283ACV	<i>Aspergillus</i> spp.
57BHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	-	---
370BHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	-	---
369BHJ	<i>Aspergillus</i> spp.	--	---

Secuencias de referencia. Para el análisis filogenético se utilizaron 17 secuencias de referencia obtenidas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Cuadro 2), correspondientes a diversas especies del género *Aspergillus* y una secuencia de *Trichoderma reesei* como grupo externo.

Cuadro 4. Secuencias de referencia

Número Acceso (GenBank)	Especie y/o genero	Sección
EF591712.1	<i>Aspergillus ustus</i>	Usti
EF591710.1	<i>Aspergillus puniceus</i>	Usti
EF591709.1	<i>Aspergillus pseudodeflectus</i>	Usti
FN908395.1	<i>Aspergillus calidoustus</i>	Usti
EU076351.1	<i>Aspergillus insuetus</i>	Usti
EF591713.1	<i>Aspergillus flosus</i>	Usti
AB894615.1	<i>Aspergillus fumisynnematus</i>	Fumigati
AB894620.1	<i>Aspergillus lentulus</i>	Fumigati
DQ094848.1	<i>Aspergillus brevipes</i>	Fumigati
DQ534108.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigati
HE974402.1	<i>Aspergillus unilateralis</i>	Fumigati
DQ094865.1	<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>	Fumigati
DQ094868.1	<i>Aspergillus novofumigatus</i>	Fumigati
AY704271.1	<i>Aspergillus niger</i>	Nigri
NW_001884660.1	<i>Aspergillus oryzae</i>	Flavi
NT-165933.1	<i>Aspergillus terreus</i>	Terri
NW_006711174.1	<i>Trichoderma reesei</i>	Grupo externo

Obtención de cultivos monospóricos. A partir de cada uno de los aislados utilizados (Cuadro 1), crecidos durante 1-2 semanas en agar-Mycobiotic (Bioxón, México) a 30 °C, se obtuvo una suspensión de conidios en 1 mL de amortiguador de fosfatos (pH 7.4) y 0.05% Tween 20 (PBST). Esta suspensión fue diluida 1:1000 y se tomaron 50 µL de esta dilución para sembrarla en caja de Petri conteniendo medio agar-Mycobiotic (Bioxón) para plaquear. Las cajas fueron incubadas a 30 °C y revisadas hasta observar crecimiento colonial, se seleccionó sólo una colonia por cada placa, tomando en cuenta que ésta se encontrara independiente de colonias cercanas y una vez separada, ésta fue transferida a otra caja e incubada a 30 °C hasta observar crecimiento y esporulación de la colonia.

Preservación de cultivos monospóricos. Los cultivos monospóricos obtenidos como se describió anteriormente, fueron resembrados en tubos con agar

Sabouraud (Bioxón) e incubados a 30 °C hasta obtener esporulación abundante. Posteriormente, se adicionó a cada tubo, 1.5 mL de solución salina 0.85% añadiendo 0.05 mL de PBS-Tween 20 (PBST), se agitó para obtener una suspensión homogénea de conidios. Enseguida se transfirieron 130 µL de esta suspensión, a tubos de plástico con tapa de rosca (10 tubos), conteniendo 1 mL de agua estéril cada uno, para su preservación a 4 °C.

Obtención de DNA genómico. A partir de cada cultivo monospórico de *Aspergillus* spp. sembrado en tubo con agar-papa-dextrosa (Bioxón), se obtuvo una suspensión de conidios de la siguiente manera: se agregó a cada tubo 1 mL de PBST y se resuspendió por agitación en vórtex (Daigger, USA), posteriormente se sembró en 50 mL de medio líquido YPD, inmediatamente se incubó a 37 °C en agitación durante 2 días o hasta observar crecimiento micelial. Se cosechó individualmente la biomasa micelial de cada aislado por filtración al vacío, utilizando un embudo Kitasato con papel filtro estéril. Enseguida, se lavó el micelio con agua Milli Q estéril y se eliminó la mayor cantidad de agua posible, posteriormente, la extracción del DNA se llevó a cabo con el Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, USA), de la siguiente manera: se tomaron aproximadamente 100 mg de masa micelial seca y se depositaron en microtubos de 1.5 mL que contenían 0.2 g de perlas de vidrio estériles (400 a 455 µm de diámetro), enseguida se adicionaron 400 µL de amortiguador de lisis AP1 del Kit (Qiagen). Para la ruptura de las células, se utilizaron las condiciones reportadas por Duarte-Escalante *et al.*⁴⁴, es decir, 6 periodos de 40 s a 6 m/s, con 5 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Después de romper el micelio, se adicionaron 4 µL de RNAsa (100

mg/mL), se agitó vigorosamente en el vórtex y se incubó la mezcla por 10 min a 65 °C, mezclando 2 ó 3 veces por inversión. Pasados 10 min, se adicionaron 130 µL del amortiguador AP2 y se incubó por 5 min en hielo y se centrifugó durante 5 min a 13 200 rpm. Se transfirió el volumen total del sobrenadante a la columna lila QIAshredder mini spin, sostenida en un tubo colector de 2 mL para centrifugar a 13 200 rpm por 2 min. Se cuantificó el volumen del sobrenadante obtenido en el tubo colector y éste fue transferido a un tubo nuevo, y se adicionaron 1.5 volúmenes del amortiguador AP3/E. La mezcla se resuspendió con ayuda de una micropipeta y se tomaron 650 µL de ésta, para transferirlos a la columna blanca DNeasy mini spin, sostenida en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó 1 min a 9 000 rpm desechando el sobrenadante obtenido. Se repitió este paso hasta pasar todo el volumen por la columna blanca. Posteriormente, se cambió el tubo colector, y se realizaron dos lavados con 500 µL del amortiguador AW, el primero se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm y el segundo 2 min a 14 000 rpm. Por último, la columna se colocó en un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL, adicionando a la columna, 100 µL de agua Milli Q, se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm para eluir, y se realizó una segunda elución con 50 µL de agua Mili Q. La concentración de los DNAs obtenidos se determinó por espectrometría a 260 nm (DeNovix DS-11, USA), y se realizaron por duplicado. Los resultados se corroboraron por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% teñido con 0.8 µL/100 mL de GelRed 10,000X (Biotium, USA) en una cámara de electroforesis, comparando con diferentes concentraciones de fago λ (GIBCO BRL®, USA) de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/µL, dejándolo correr por un tiempo aproximado de 45 minutos a 100 V y para visualizarlo se utilizó un

fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad USA).

Posteriormente, el DNA de cada uno de los aislados de *Aspergillus* spp. fue diluido en agua Milli Q para obtener una concentración final de 10 ng/μL para su utilización en los ensayos de PCR.

PCR utilizando la secuencia parcial de gene de actina. Se utilizó el método descrito por Carbone y Konh⁷, el cual utiliza oligonucleótidos que delimitan una región de 300 pb. Se emplearon las siguientes condiciones iniciales en un volumen de reacción de 20 μL: de 0.2-0.5 ng en 10μL de DNA, en un volumen de reacción de 20 μL, amortiguador 1X, 200 μM de dNTPs (Applied Biosystems, USA), 2 mM de MgCl₂, 0.5 U de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems) y 0.5 pmol de cada oligonucleótido Act-783R-(5´-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3´) y Act-512F-(5´-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3), (Sigma-Aldrich, USA), con el siguiente programa; un hold a 95 °C por 8 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 15 s, 55 °C por 20 s, y 72 °C por 60 s, con un paso de extensión final a 72 °C por 5 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Esco Swift®Maxi™ThermalCycler Block (Esco, Singapore). Los productos amplificados fueron separados en geles de agarosa al 2% teñido con GelRed 10000X (Biotium) en amortiguador TBE 0.5 X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) a 100 V por un tiempo aproximado de 60 min. Se utilizó el marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA). El gel fue visualizado en un fotodocumentador Gel Doc™ XR (Bio-Rad). Para obtener las condiciones óptimas para la PCR, se realizaron curvas de DNA, *Taq* polimerasa, oligonucleótidos, MgCl₂ y pruebas de temperatura de alineamiento.

Purificación de amplicones obtenidos por PCR. Los amplicones obtenidos en la PCR se purificaron con el kit QIAquick Gel Extraction kit (Quiagen, USA), según las indicaciones del fabricante; Brevemente, se colocaron 25 μ L del producto de amplificación de cada aislado junto con 2 μ L del amortiguador, en un gel de agarosa al 2% teñido con GelRed 10,000X (Biotium), en amortiguador TBE 0.5 X. El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante un tiempo aproximado de 90 min o hasta que el marcador se desplegara correctamente, una vez concluido el corrimiento, se observó el gel a través de un transiluminador de luz UV y se cortaron las bandas amplificadas, se eliminó el exceso de agarosa y enseguida las bandas fueron colocados en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se adicionaron 3 volúmenes de amortiguador QG y los tubos fueron incubados a 50 °C por 10 min, mezclando de 2-3 veces durante la incubación, se agregaron 800 μ L de esta mezcla a la columna QIAquick spin (para unir DNA), soportada en un tubo de colección de 2 mL, y se centrifugó por 1 min a 13 000 rpm, se descartó el líquido colectado en el tubo de colección. Se repitió este paso hasta pasar todo el volumen por la columna, posteriormente se adicionaron 500 μ L de amortiguador QG a la columna QIAquick (para remover todos los restos de agarosa) y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Posteriormente, para lavar la muestra, se agregaron 750 μ L de amortiguador PE a la columna y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm, se descartó el amortiguador PE y se repitió este paso, sin adicionar más amortiguador PE, para remover por completo el etanol residual. Se colocó la columna QIAquick en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril para eluir el DNA y se agregaron 30 μ L de agua Milli Q en el centro de la membrana de la columna QIAquick, se dejó incubar por 1 min a temperatura ambiente y posteriormente se

centrifugó por 1 min a 13,000 rpm, obteniéndose así el DNA purificado. Para corroborar el tamaño, concentración y la pureza del amplicón se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente.

Secuenciación. Los amplicones purificados fueron enviados para secuenciar en ambas direcciones, a la Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, utilizando un secuenciador automatizado ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Las secuencias fueron editadas usando los programas Chromas Lite 2.3 software (<http://www.technelysium.com.au>) y el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Las secuencias fueron analizadas utilizando el algoritmo BLAST⁴⁵, para correlacionar identidad de cada uno de los aislados y comparar la identificación fenotípica contra la molecular.

Alineamiento de secuencias. Las secuencias obtenidas fueron utilizadas para analizar la relación filogenética de todos los aislados estudiados con las secuencias de referencia, éstas últimas, correspondientes a varias especies del género *Aspergillus*, representativas de las secciones *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri* y *Usti*, obtenidas del GenBank. Se realizaron alineamientos múltiples utilizando los programas: T-coffe⁴⁶; ClustalW2^{47,48,49}; Muscle⁵⁰; Multalign^{51,52} y MAFFT^{53,54}. Se realizó una evaluación de los alineamientos múltiples considerando los siguientes parámetros: suma de pares y mínima entropía, con el programa GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Por otro lado, para obtener el mejor modelo evolutivo se utilizó el programa JModeltest^{55,56}, considerando los parámetros: criterio de información de AKAIKE (AIC), criterio de información bayesiano (BIC),

criterio de verosimilitud (-lnL) y teoría de decisiones (DT), que posteriormente fue utilizado para llevar a cabo el análisis filogenético de todos los aislados.

Análisis filogenético. Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo empleando los métodos de máxima verosimilitud, máxima parsimonia e inferencia bayesiana.

El árbol de máxima verosimilitud se construyó a través de una búsqueda heurística, bajo los criterios de verosimilitud con 100 repeticiones de secuencias de adición aleatoria y el algoritmo de intercambio de ramas en el árbol por bisección-reconexión (TBR), utilizando el programa MEGA 6.0⁵⁷.

El análisis de máxima parsimonia se realizó con el programa TNT⁵⁸ (<http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/TNT/>), a través de una búsqueda heurística por TBR. Todos los estados de caracteres se trataron como desordenados e igualmente ponderados. Las probabilidades de arranque (BP) se estimaron a partir de 2000 repeticiones. Se eligió el árbol de consenso estricto por la regla de mayoría.

El método de inferencia bayesiana se llevó a cabo con el programa MrBayes v.3.1.2⁵⁹. Se utilizaron probabilidades posteriores para 10000000 de generaciones.

Análisis de bootstrap. Se empleó un análisis de bootstrap para estimar el apoyo de las ramas en los árboles construidos, tanto para máxima verosimilitud como para máxima parsimonia, se realizaron 1000 réplicas. Para el árbol construido por inferencia bayesiana las probabilidades posteriores fueron utilizadas para estimar la confiabilidad de la topología⁶⁰.

RESULTADOS

Obtención y preservación de cultivos monospóricos. Se obtuvieron cultivos monospóricos de los 89 aislados incluidos en el estudio, los cuales fueron sembrados en medio agar Sabouraud y dos tubos/aislado fueron almacenados para su preservación a 4°C (figura 1). Por otro lado, a partir de cada cultivo monospórico, se hizo una suspensión de conidios y se repartió en 10 tubos/aislado para preservarlos en agua, también a 4°C (figura 2). Se eligieron estos dos métodos de preservación ya que han mostrado ser eficientes y fácil de llevar a cabo.

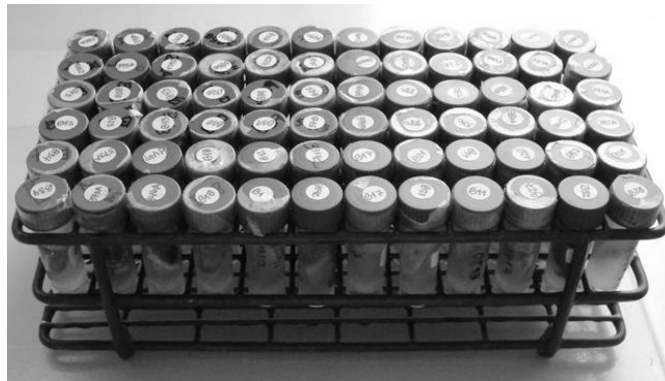


Figura 1. Cultivos monospóricos de *Aspergillus* spp. conservados en medio agar-Sabouraud a 4 °C.



Figura 2. Cultivos monospóricos de *Aspergillus* spp. preservados en agua a 4 °C.

Obtención de DNA genómico. Las concentraciones de DNA de los 89 aislados de *Aspergillus* spp. incluidos en el estudio, cuantificadas por electroforesis, fueron desde 10 hasta 100 ng/ μ L (Figura 3 y 4), mientras que las concentraciones cuantificadas por espectrofotometría estuvieron en un rango de 9.80-147.65 ng/ μ L (Cuadro 3). Ambos métodos nos permitieron corroborar la calidad del DNA y establecer las concentraciones idóneas de DNA necesario para realizar la PCR.

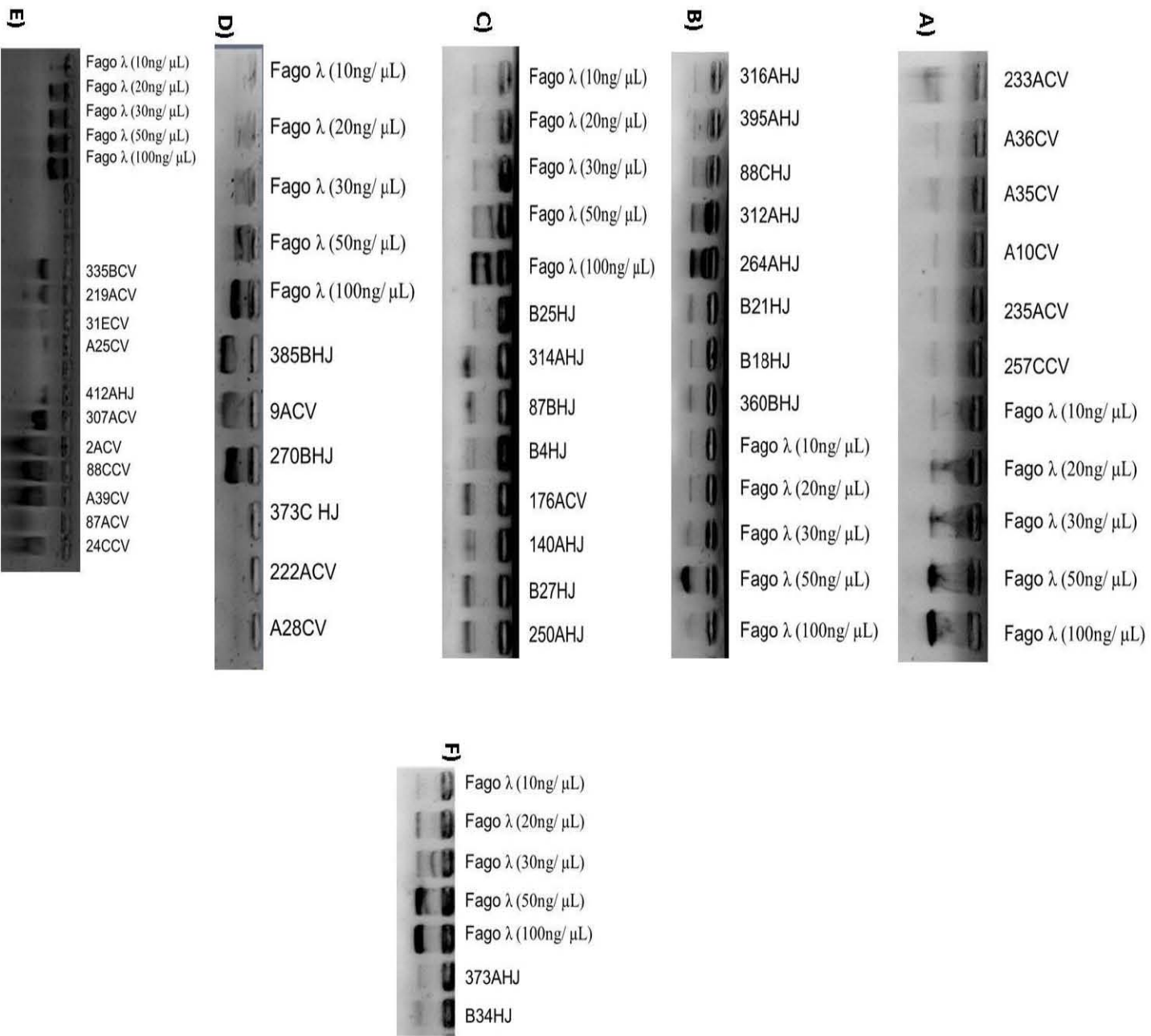


Figura 3A-F. Cuantificación de DNA obtenido de diferentes aislados de *Aspergillus* spp. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% teñida con GelRed (10000X) y se comparó con diferentes concentraciones de fago λ. **3A:** carriles 1-6, aislados 233ACV,

A36CV, A35CV, A10CV, 235ACV y 257ACV; carriles 7-11, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L. **3B**: carriles 1-8, aislados 316AHJ, 395AHJ, 88CHJ, 312AHJ, 264AHJ, B21HJ, B18HJ y 360BHJ; carriles 9-13: concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L. **3C**: carriles 1-5, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L; carriles 6-13, aislados B25HJ, 314AHJ, 87BHJ, B4HJ, 176ACV, 140AHJ, B27HJ y 250AHJ. **3D**: carriles 1-5, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L; carriles 6-11, aislados 385BHJ, 9ACV, 270BHJ, 373CHJ, 222ACV y A28CV. **3E**: carriles 1-5, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L; carriles 9-12, aislados 335BCV, 219ACV, 31ECV, A25CV; carriles 14-20, aislados 412AHJ, 307ACV, 2ACV, 88CCV, A39CV, 87ACV y 24CCV. **3F**: carriles 1-5, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L; carriles 6-7, aislados 373AHJ y B34HJ.

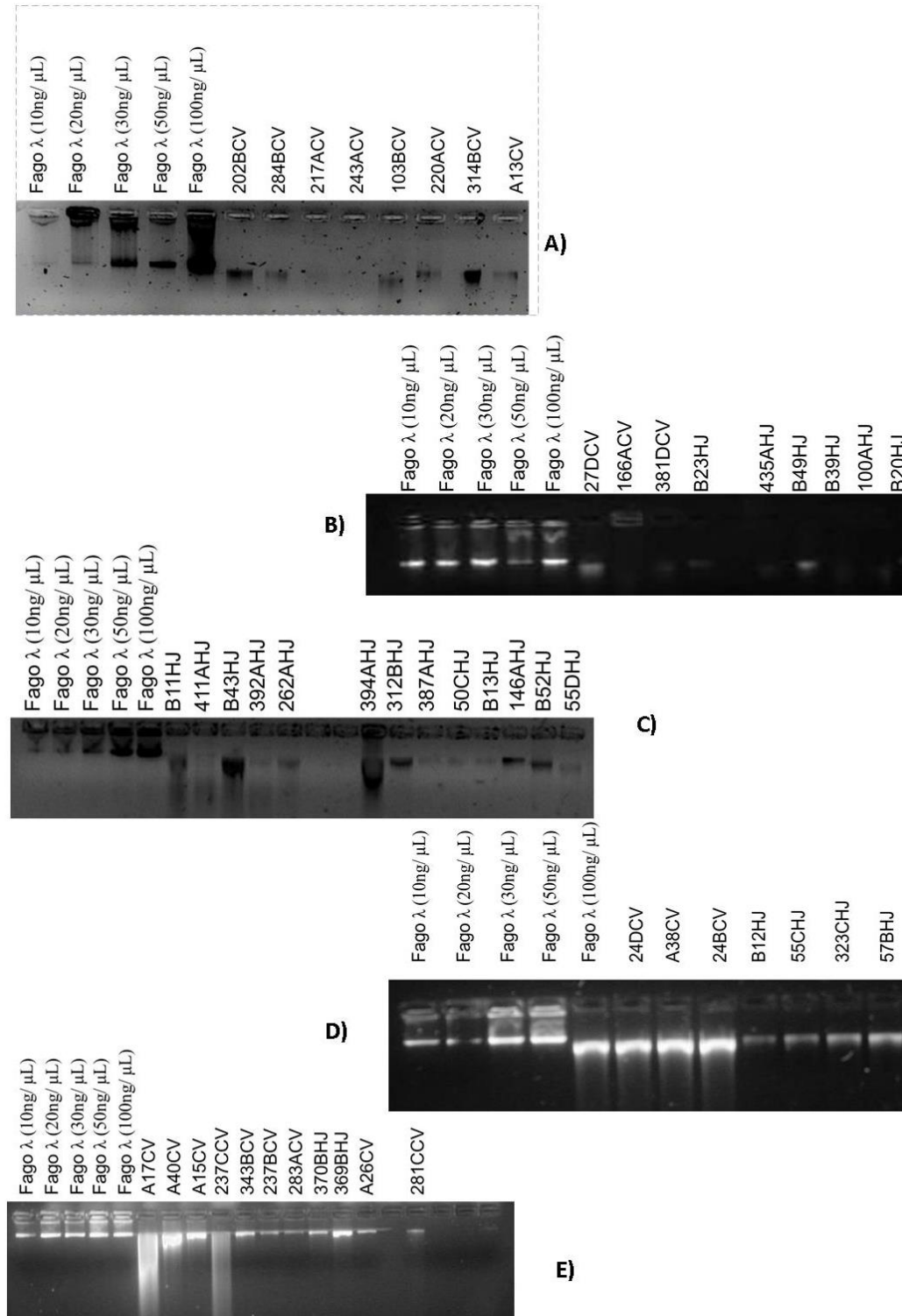


Figura 4A-E. Cuantificación de DNA obtenido de diferentes aislados de *Aspergillus* spp. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% teñida con GelRed (10000X) y se comparó con diferentes concentraciones de fago λ. **4A:** carriles 1-5, concentraciones de

fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L; carriles 6-13 aislados 202BCV, 284BCV, 217ACV, 243ACV, 103BCV, 220ACV, 314BCV y A13CV. **4B**: carriles 1-5, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L; carriles 6-9 y 11-15, aislados 27DCV, 166ACV, 381DCV, B23HJ, 435AHJ, B49HJ, B39HJ, 100AHJ y B20HJ. **4C**: carriles 1-5, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L; carriles 6-10 Y 13-20, aislados B11HJ, 411AHJ, B43HJ, 392AHJ, 262AHJ, 394AHJ, 312BHJ, 387AHJ, 50CHJ, B13HJ, 146AHJ, B52HJ y 55DHJ. **4D**: carriles 1-5, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L; carriles 6-12, aislados 24DCV, A38CV, 24BCV, B12HJ, 55CHJ, 323CHJ y 57BHJ. **4E**: carriles 1-5, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L; carriles 9-15 y 17, aislados 17CV, A40CV, A15CV, 237CCV, 343BCV, 237BCV, 283ACV, 370BHJ, 369BHJ, A26CV y 281CCV.

Cuadro 5. Cuantificación de DNA por espectrofotometría

Hospital Juárez de México			Instituto de Oftalmología "Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana"		
Número de aislado	Primera lectura ng/ μ L	Segunda lectura ng/ μ L	Número de aislado	Primera lectura ng/ μ L	Segunda lectura ng/ μ L
385BHJ	34.78	34.80	233ACV	27.35	27.37
B18HJ	66.15	66.12	A36CV	16.20	16.23
B11HJ	73.85	73.90	A35CV	43.85	43.79
B23HJ	15.55	16.80	A10CV	100.00	100.00
411AHJ	56.20	56.21	235ACV	76.23	76.19
B43HJ	16.80	17.35	257CCV	34.06	34.04
392AHJ	16.35	16.37	176ACV	28.60	28.63
B21HJ	21.25	21.26	9ACV	34.20	34.23
100AHJ	13.25	13.23	222ACV	27.50	27.49
435AHJ	40.75	40.56	A28CV	23.60	23.59
270BHJ	20.24	20.23	202BCV	65.30	65.32
B4HJ	35.20	35.12	281CCV	24.05	24.10
262AHJ	10.05	10.00	284BCV	27.45	27.42
394AHJ	9.80	9.82	217ACV	34.87	34.87
B20HJ	56.87	56.89	243ACV	28.90	28.89
373CHJ	13.35	13.54	103BCV	15.85	15.90
312BHJ	18.70	18.73	220ACV	63.55	62.54
314AHJ	13.45	13.80	314BCV	22.70	22.67
387AHJ	23.55	23.56	A13CV	31.50	31.50
412AHJ	54.60	54.65	166ACV	21.95	22.05
395AHJ	23.67	23.68	381DCV	73.65	73.59
50CHJ	10.85	11.00	A26CV	147.65	147.62
264AHJ	15.45	15.46	219ACV	38.25	38.30
140AHJ	24.70	24.70	31ECV	42.70	42.72

B25HJ	15.10	15.40	A25CV	80.38	80.32
250AHJ	17.30	17.10	307ACV	18.30	18.45
B49HJ	43.60	46.54	2ACV	16.95	16.95
87BHJ	54.87	54.79	88CCV	36.45	36.43
B27HJ	45.30	45.30	A39CV	65.10	65.31
B13HJ	10.30	10.65	335BCV	31.60	31.35
146AHJ	13.05	13.25	87ACV	65.32	65.31
88CHJ	25.60	25.62	24CCV	58.45	58.30
373AHJ	18.80	18.79	27DCV	10.55	10.50
B34HJ	13.30	12.75	24DCV	27.60	27.45
B39HJ	90.45	90.50	A38CV	40.00	40.02
B52HJ	56.40	56.39	24BCV	76.30	76.30
55DHJ	27.60	27.45	A17CV	49.10	49.19
B12HJ	44.80	44.89	A40CV	23.91	24.00
360BHJ	36.30	36.29	A15CV	45.50	45.43
316AHJ	10.10	10.10	237CCV	43.86	43.85
312AHJ	65.2	65.20	343BCV	74.45	74.43
55CHJ	22.45	22.43	237BCV	84.30	84.32
323CHJ	73.65	73.67	283ACV	55.96	55.97
57BHJ	20.05	20.03	-	--	--
370BHJ	18.00	18.01	--	--	--
369BHJ	18.65	18.65	--	--	--

Normalización de las condiciones de reacción para la amplificación de la secuencia parcial del gene de actina. Para encontrar las condiciones óptimas para las reacciones de PCR, se realizaron pruebas de temperatura de alineamiento a 55 °C (Figura 5), 56 °C (Figura 6), 57 °C (Figura 7), 58 °C (Figura 8) y 59 °C (Figura 9), eligiendo ésta última como la temperatura óptima. Para la curva de concentración de MgCl₂ se utilizaron concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, y 2.5 mM (Figura 10), y se eligió la de 1.5 mM como la mejor. Para la curva de concentración de DNA se utilizaron concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 65 ng/μL (Figura 11), eligiendo la concentración de 10 ng/μL como la concentración óptima.

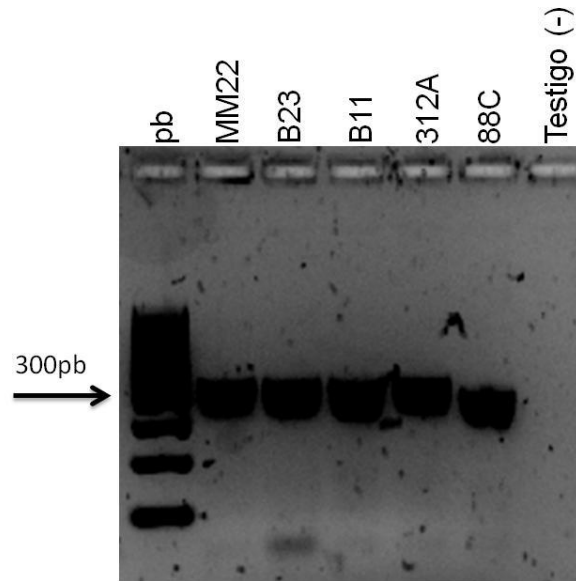


Figura 5. Temperatura de alineamiento a 55°C. La PCR se realizó con modificaciones, de acuerdo a las condiciones descritas por Carbone y Kohn (1999).

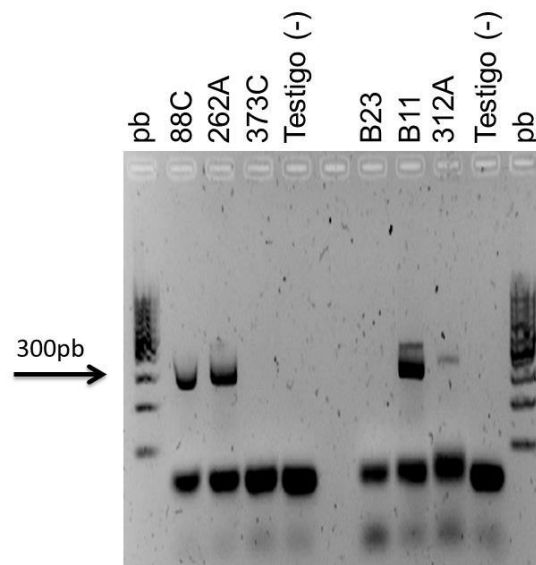


Figura 6. Temperatura de alineamiento a 56°C. La PCR se realizó con modificaciones, de acuerdo a las condiciones descritas por Carbone y Kohn (1999).

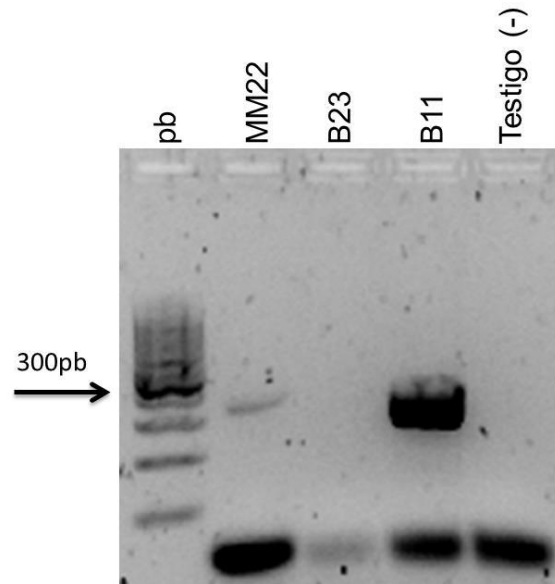


Figura 7. Temperatura de alineamiento a 57°C. La PCR se realizó con modificaciones, de acuerdo a las condiciones descritas por Carbone y Kohn (1999).

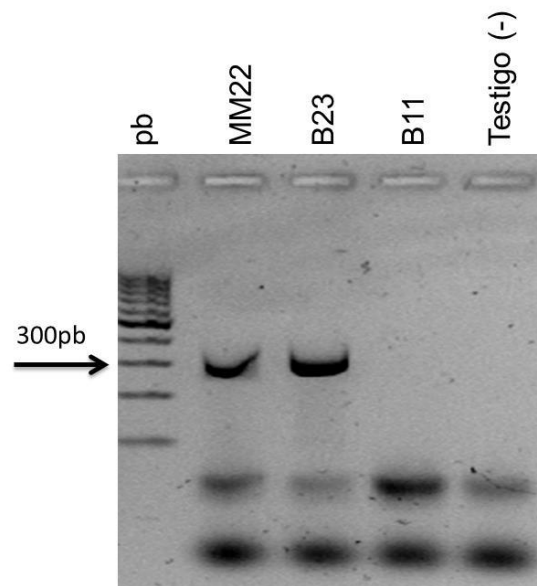


Figura 8. Temperatura de alineamiento a 58°C. La PCR se realizó con modificaciones, de acuerdo a las condiciones descritas por Carbone y Kohn (1999).

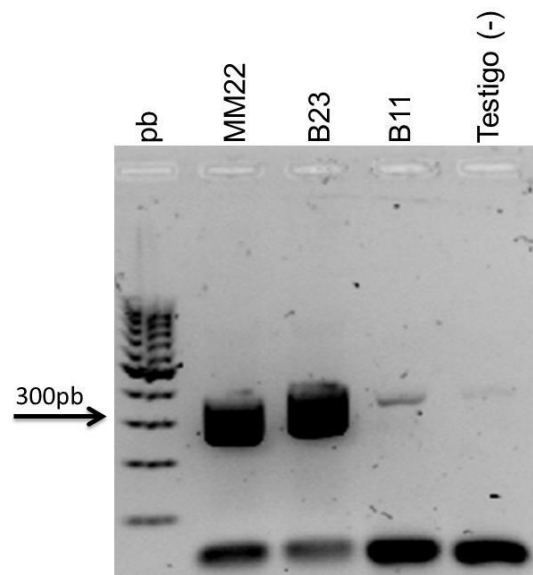


Figura 9. Temperatura de alineamiento a 59°C. La PCR se realizó con modificaciones, de acuerdo a las condiciones descritas por Carbone y Kohn (1999).

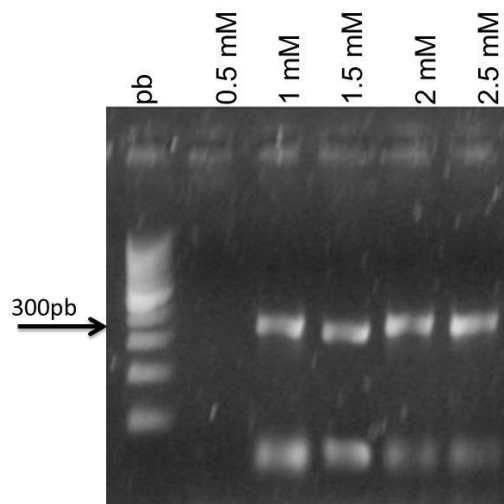


Figura 10. Curva de concentración de MgCl₂. La PCR se realizó con modificaciones a las condiciones descritas por Carbone y Kohn (1999).

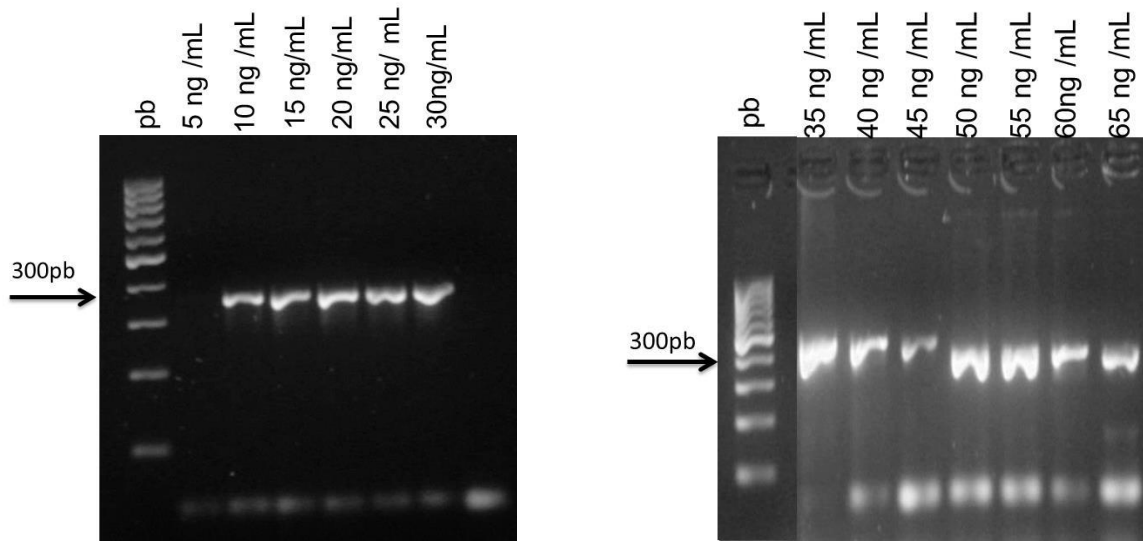


Figura 11. Curva de concentración de DNA. La PCR se realizó con modificaciones a las condiciones descritas por Carbone y Kohn (1999), como se describe en materiales y métodos.

Con base en los resultados obtenidos en la normalización de las condiciones para la PCR, se establecieron las condiciones óptimas que fueron las siguientes: 10 ng de DNA en un volumen de reacción de 25 μ L, conteniendo amortiguador 1X, 200 μ M de dNTPs (Applied Biosystems), 1.5 mM de $MgCl_2$, 1 U de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems) y 10 pmol de cada oligonucleótido Act-783R y Act-512F, con el siguiente programa; un hold a 95 °C por 8 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 15 s, 59 °C por 20 s, y 72 °C por 60 s, con un paso de extensión final a 72 °C por 5 min.

El DNA de todos los aislados utilizados en el presente estudio y probados a través de la PCR, dieron como resultado el amplicón esperado de \cong 300 pb, correspondiente a la secuencia parcial del gene de actina como se muestra en la Figura 12 y Figura 13.

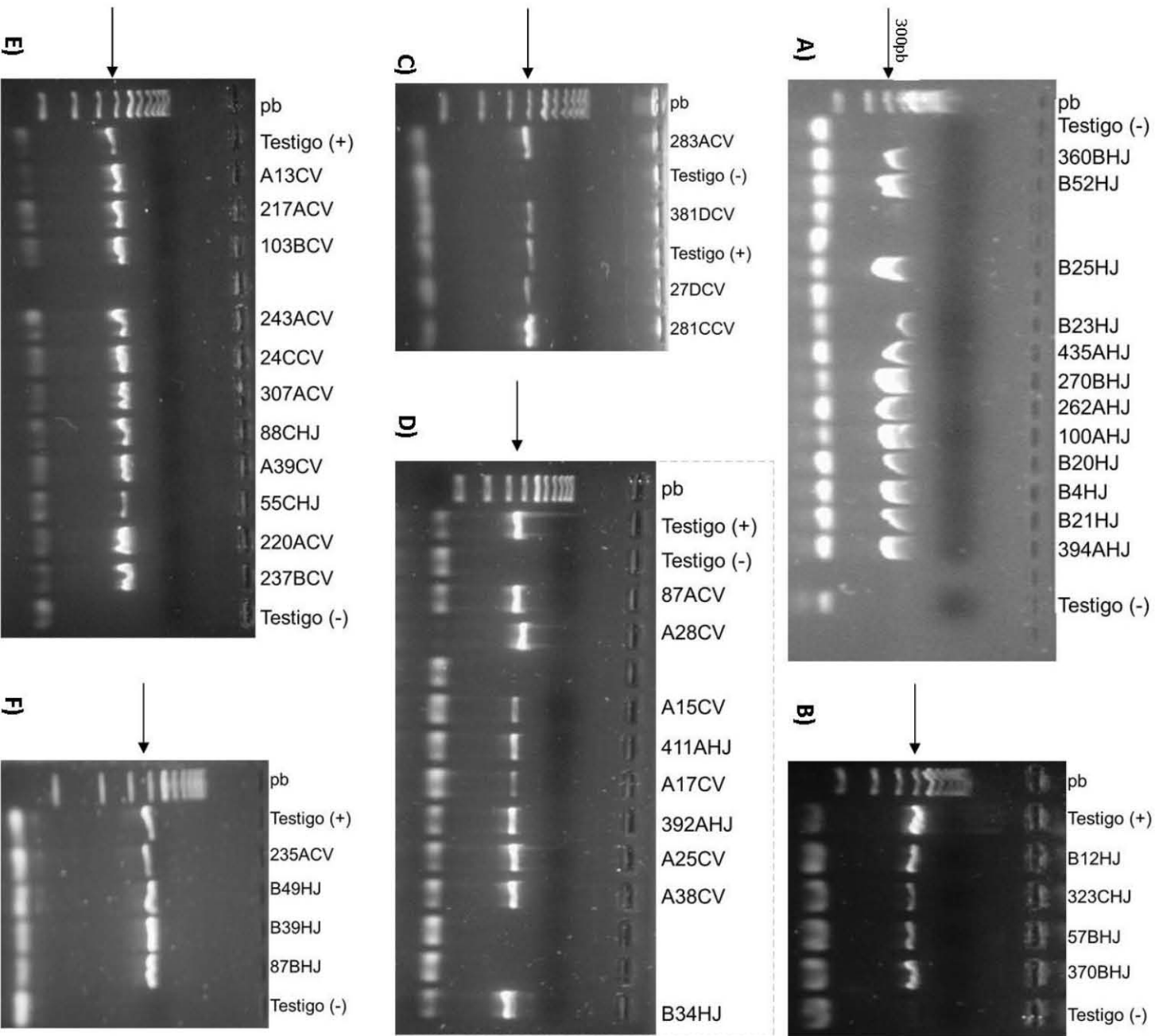


Figura 12. PCR con el gene de actina de DNA de todos los aislados de *Aspergillus* spp., se obtuvo un amplicón de 300 pb. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2%, teñido GelRed, como se describe en materiales y métodos.

12A: carril 1, pb; carriles 2 y 19, testigo (-); carriles 3-4, 7, 9-17 aislados 360BHJ, B52HJ, B25HJ, B23HJ, 435AHJ, 270BHJ, 262AHJ, 100AHJ, B20HJ, B4HJ, B21HJ y 394AHJ .
12B: carril1, pb; carriles2 y 7, testigo (+) y testigo (-); carriles 3-6, aislados B12HJ, 323CHJ, 57BHJ y 370BHJ. **12C:** carril 1, pb; carriles 3 y 5, testigo (-) y testigo (+); carriles2, 3, 5-6, aislados 283ACV, 381DCV, 27DCV y 281CCV. **12D:** carril 1, pb; carriles 2-3, testigo (+) y testigo (-); carriles 4-5, 7-12 y 15 aislados 87ACV, A28CV, A15CV, 411AHJ, A17CV, 392AHJ, A25CV, A38CV y B34HJ. **12E:** carril 1, pb; carriles 2 y 15, testigo (+) y testigo (-); carriles 3-5 y 7-14, aislados A13CV, 217ACV, 103BCV, 243ACV, 24CCV, 307ACV, 88CHJ, A39CV, 55CHJ, 220ACV y 237BCV. **12F:** carril 1, pb; carriles 2 y 7, testigo (+) y testigo (-); carriles 3-6 aislados 235ACV, B49HJ, B39HJ y 87BHJ.

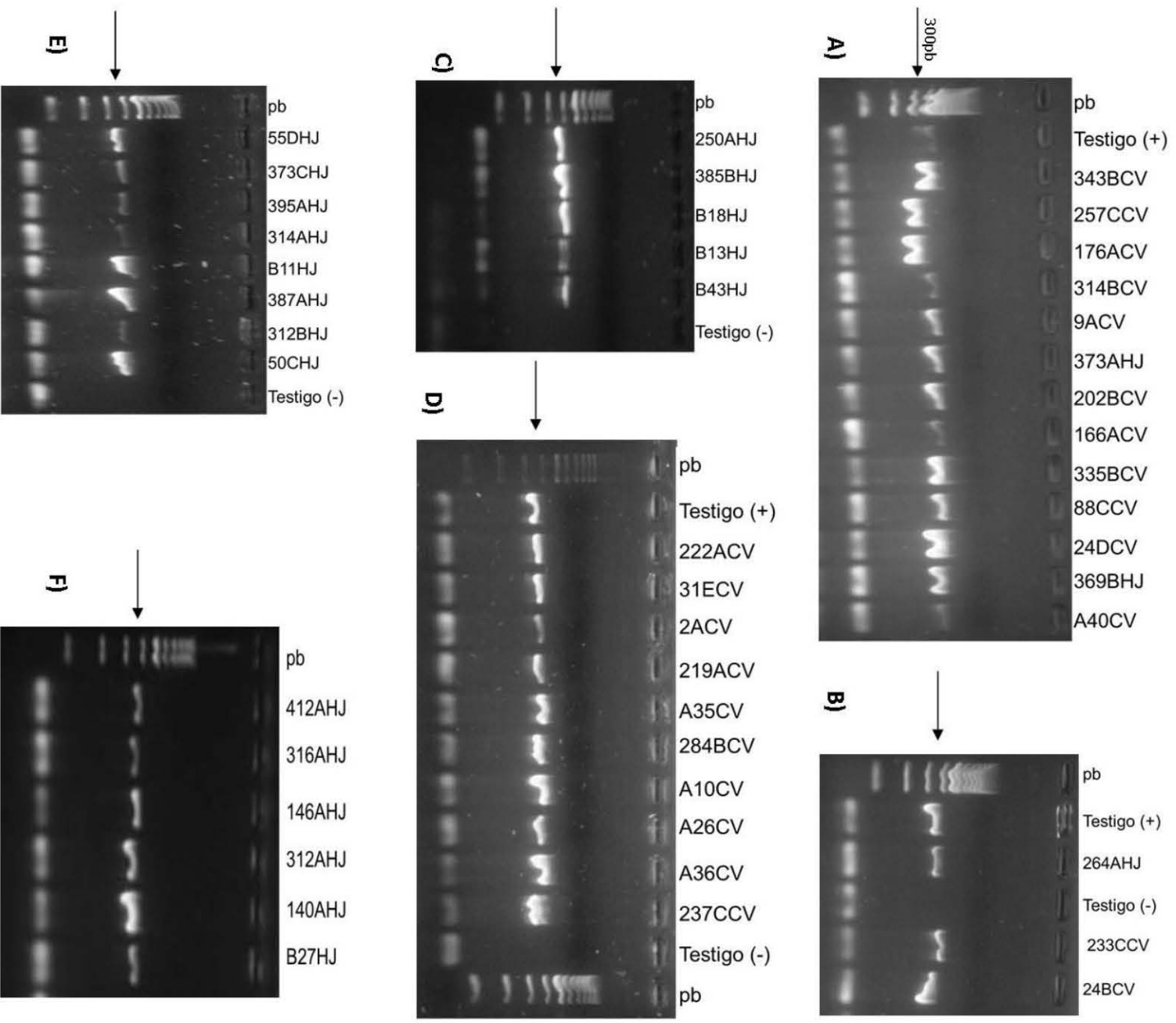


Figura 13. PCR con el gene de actina de DNA de todos los aislados de *Aspergillus* spp., se obtuvo un amplificación de 300 pb. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2%, teñido GelRed, como se describe en materiales y métodos. **13A:** carril 1, pb; carril 2, testigo (+); carriles 3-15, aislados 343BCV, 257CCV, 176ACV,

314BCV, 9ACV, 373AHJ, 202BCV, 166ACV, 335BCV, 88CCV, 24DCV, 369BHJ y A40CV. **13B**: carril 1, pb; carriles 2 y 4, testigo (+) y testigo (-); carriles 3 y 5-6, aislados 264AHJ, 233CCV y 24BCV. **13C**: carril 1, pb; carriles 2-6, aislados 250AHJ, 385BHJ, B18HJ, B13HJ y B43HJ; carril 7, testigo (-). **13D**: carriles 1 y 14, pb; carriles 2 y 13, testigo (+) y testigo (-); carriles 3-12, aislados 222ACV, 31ECV, 2ACV, 219ACV, A35CV, 284BCV, A10CV, A26CV, A36CV y 237CCV. **13E**: carril 1, pb; carriles 2-9, aislados 55DHJ, 373CHJ, 395AHJ, 314AHJ, B11HJ, 387AHJ, 312BHJ y 50CHJ; carril 10, testigo (-). **13F**: carril 1, pb; carriles 2-7 aislados 412AHJ, 316AHJ, 146AHJ, 312AHJ, 140AHJ y B27HJ.

Purificación de los amplicones obtenidos de la PCR. Todos los amplicones de $\cong 300$ pb, obtenidos en las reacciones de PCR, como se describió en materiales y métodos, fueron purificados a partir de los geles. Figura 14 y 15.

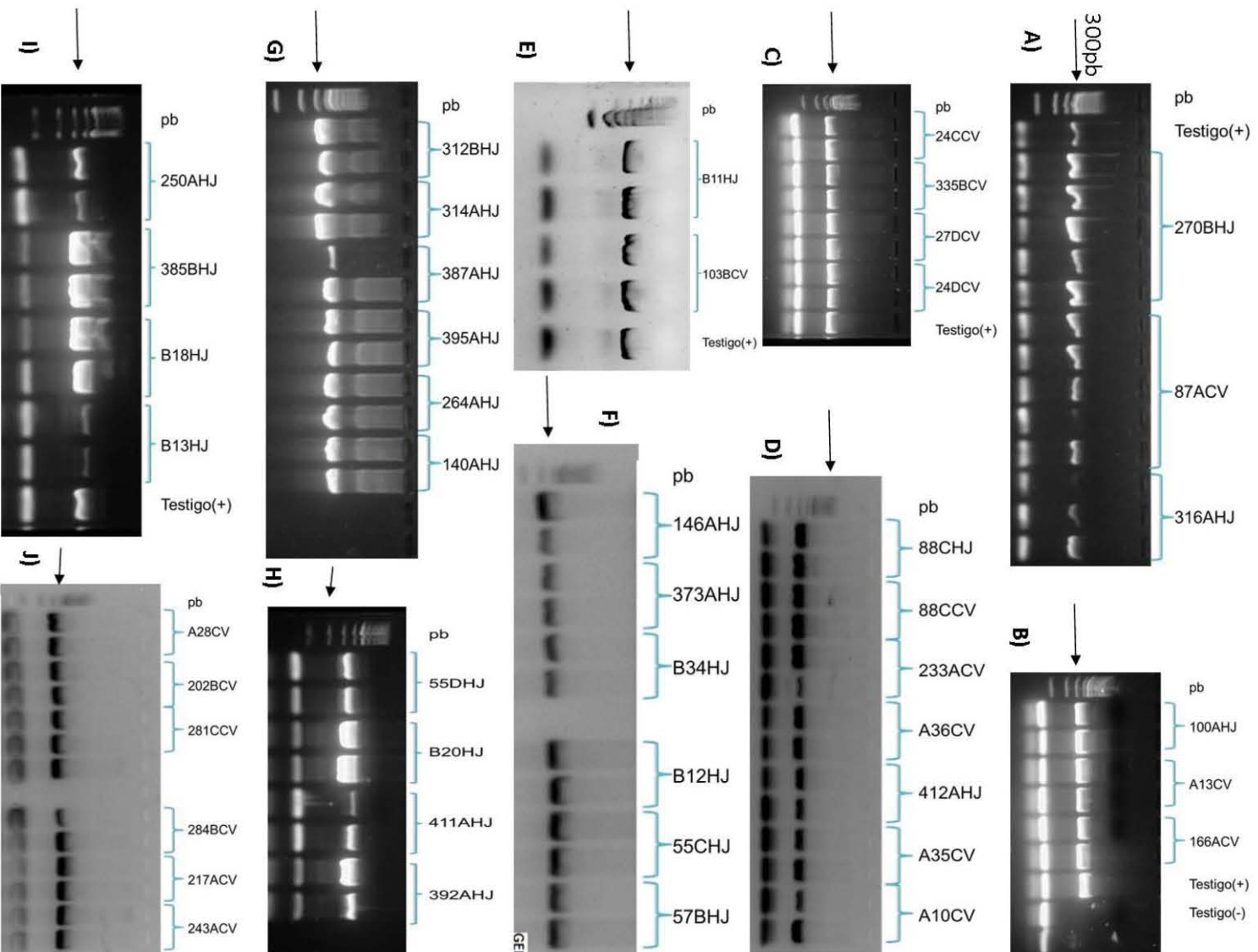


Figura 14. PCR con el gene de actina para obtener amplicones para ser purificados. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2%, teñido GelRed, como se describe en materiales y métodos. **14A:** carril 1, pb; carril 2, testigo (+);

carriles 3-7, 8-12, 13-15, aislados 3270BHJ, 87ACV y 316AHJ. **14B**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, aislados 100AHJ, A13CV y 166ACV. Carriles 8 y 9, testigo (+) y testigo (-). **14C**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, aislados 24CCV, 335BCV, 27DCV y 24DCV; carril 10, testigo (+). **14D**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, 10-11, 12-13, 14-15, aislados 88CHJ, 88CCV, 233ACV, A36CV, 412AHJ, A35CV, A10CV. **14E**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, aislados B11HJ y 103BCV; carril 6, testigo (+). **14F**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 9-10, 11-12, 13-14, aislados 146AHJ, 373AHJ, B34HJ, B12HJ, 55CHJ y 57BHJ. **14G**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, 10-11, 12-13, aislados 312BHJ, 314AHJ, 387AHJ, 395AHJ, 264AHJ y 140AHJ. **14H**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, aislados 55DHJ, B20HJ, 411AHJ y 392AHJ. **14I**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, aislados 250AHJ, 385BHJ, B18HJ y B13HJ; carril 10, testigo (+). **14J**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 10-11, 12-13, 14-15, aislados A28CV, 202BCV, 281CCV, 284BCV, 217ACV y 243ACV.

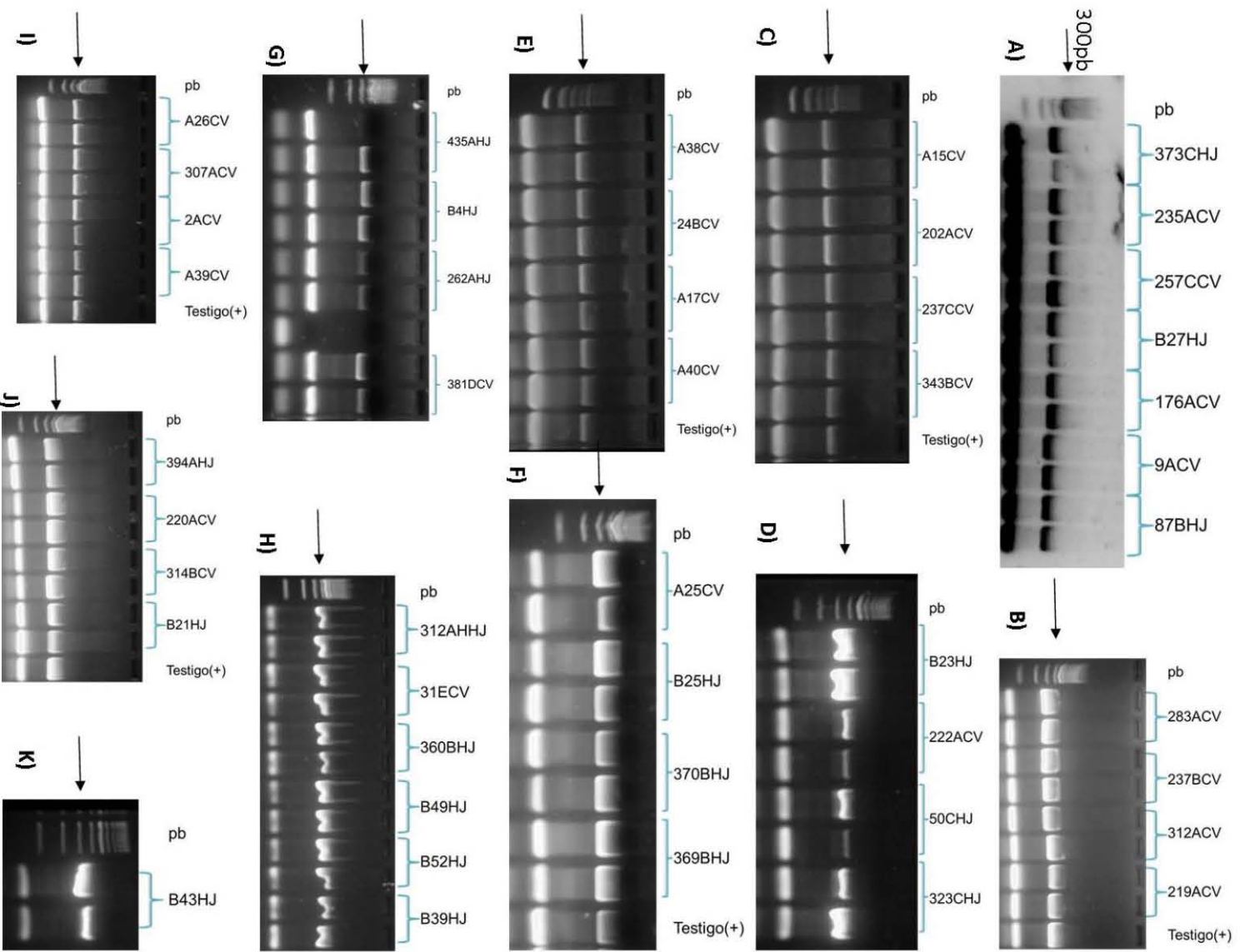


Figura 15. PCR con el gene de actina para obtener amplicones para ser purificados. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2%, teñido GelRed, como se describe en materiales y métodos. **15A:** carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, 10-11, 12-13, 14-15, aislados 373CHJ, 235ACV, 257CCV, B27HJ, 176ACV, 9ACV y

87BHJ. **15B**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, aislados 283ACV, 237BCV, 312ACV y 219ACV; Carril 10, testigo (+). **15C**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, aislados A15CV, 202ACV, 237CCV, 343BCV; carril 10, testigo (+). **15D**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, aislados B23HJ, 222ACV, 50CHJ y 323CHJ. **15E**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5,6-7, 8-9, aislados A38CV, 24BCV, A17CV y A40CV; carril 10, testigo (+). **15F**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, aislados A25CV, B25HJ, 370BHJ y 369BHJ; carril 10, testigo (+). **15G**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 9-10, aislados 435AHJ, B4HJ, 262AHJ y 381DCV. **15H**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, 10-11, 12-13, aislados 312AHJ, 31ECV, 360BHJ, B49HJ, B52HJ y B39HJ. **15I**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, aislados A26CV, 307ACV, 2ACV y A39CV; carril 10, testigo (+). **15J**: carril 1, pb; carriles 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, aislados 394AHJ, 202ACV, 314BCV y B12HJ carril 10, testigo (+). **15J**: carril 1, pb; carriles 2-3, aislado B43HJ.

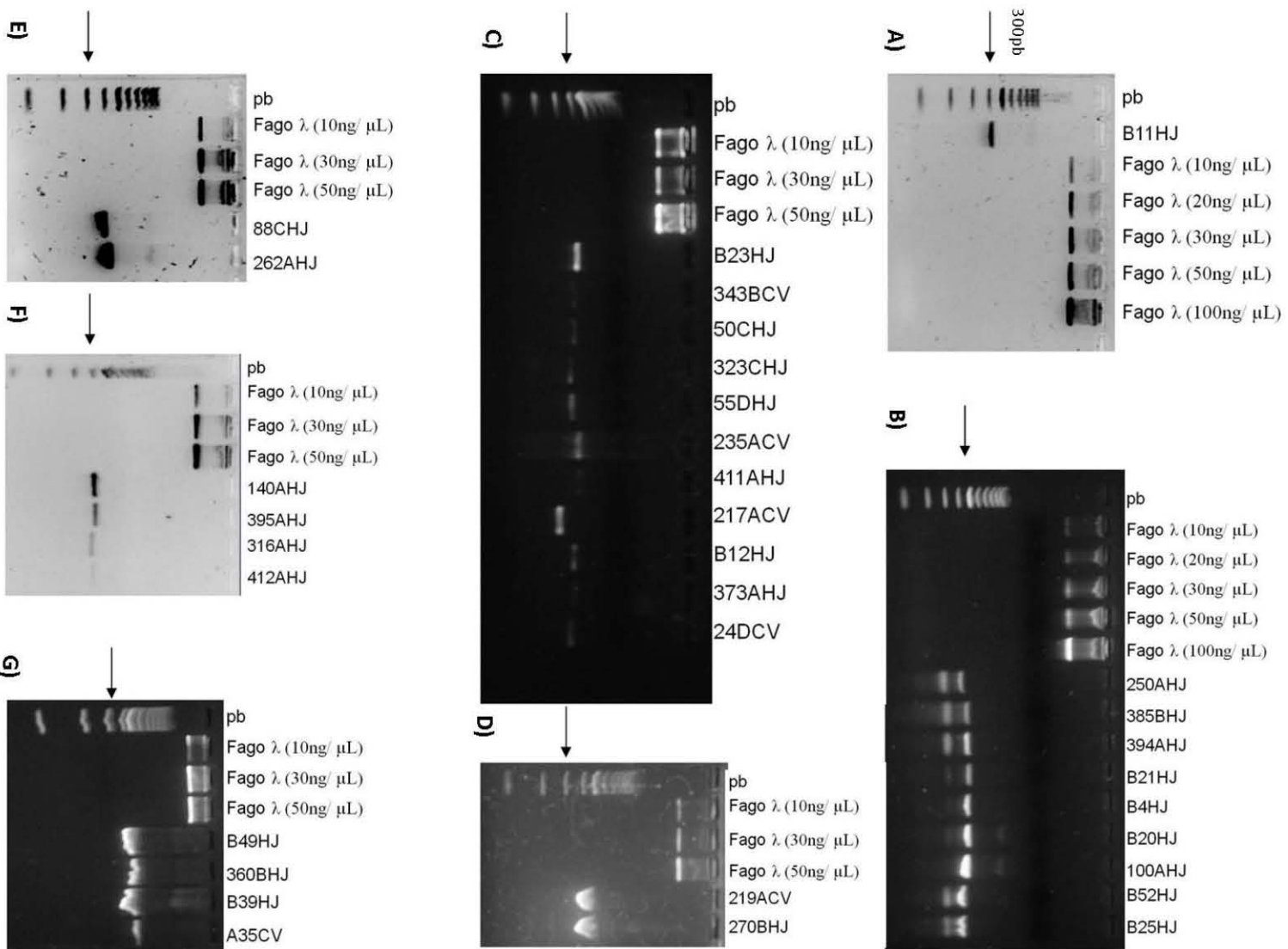


Figura 16. Amplicones obtenidos con el gene de actina de los productos purificados. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2% y fue teñido con GelRed como se describe en materiales y métodos. **16A:** carril 1, pb; carril 2, aislado

B11HJ; carriles 3-7, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L. **16B**: carril 1, pb; carriles 2-6, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L; carriles 7-15, aislados 250AHJ, 385BHJ, 394AHJ, B21HJ, B4HJ, B20HJ, 100AHJ, B52HJ y B25HJ. **16C**: carril 1, pb; carriles 2-4 concentraciones de fago λ de 10, 30 y 50 ng/ μ L; carriles 5-15, aislados B23HJ, 343BCV, 50CHJ, 323CHJ, 55DHJ, 235ACV, 411AHJ, 217ACV, B12HJ, 373AHJ y 24DCV. **16D**: carril 1, pb; carriles 2-4, concentraciones de fago λ de 10, 30 y 50 ng/ μ L; carriles 5-6, aislados 219ACV y 270BHJ. **16E**: carril 1, pb; carriles 2-4, concentraciones de fago λ de 10, 30 y 50 ng/ μ L; carriles 5-6, aislados 88CHJ y 262AHJ. **16F**: carril 1, pb; carriles 2-4, concentraciones de fago λ de 10, 30 y 50 ng/ μ L; carriles 5-8, aislados 140AHJ, 395AHJ, 316AHJ y 412AHJ. **16G**: carril 1, pb; carriles 2-4, concentraciones de fago λ de 10, 30 y 50 ng/ μ L; carriles 5-8, aislados B49HJ, 360BHJ, B39HJ y A35CV.

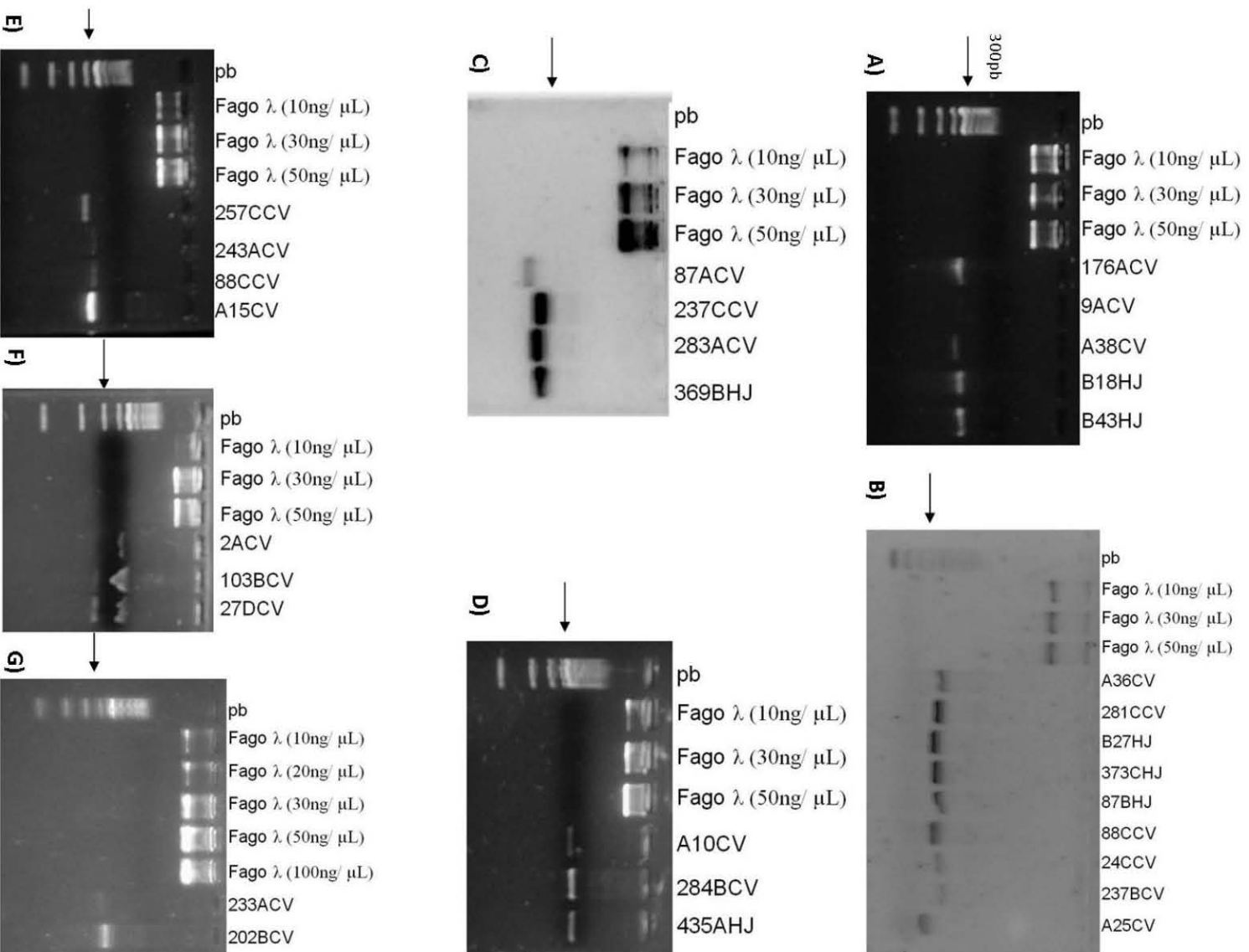


Figura 17. Amplificones obtenidos con el gene de actina de los productos purificados. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2% y fue teñido con GelRed como se describe en materiales y métodos.

17A: carril 1, pb; carriles 2-4, concentraciones de fago λ de 10, 30 y 50 ng/ μ L. carriles 5-9, aislado 176ACV, 9ACV, A38CV, B18HJ, B43HJ. **17B:** carril 1, pb; carriles 2-4, concentraciones de fago λ de 10, 30 y 50 ng/ μ L; carriles 5-13, aislados A36CV, 281CCV, B27HJ, 373CHJ, 87BHJ, 88CCV, 24CCV, 237BCV y A25CV. **17C:** carril 1, pb; carriles 2-4 concentraciones de fago λ de 10, 30 y 50 ng/ μ L; carriles 5-8, aislados 87ACV, 237CCV, 283AC y 369BHJ. **17D:** carril 1, pb; carriles 2-4, concentraciones de fago λ de 10, 30 y 50 ng/ μ L; carriles 5-7, aislados A10CV, 284BCV y 435AHJ. **17E:** carril 1, pb; carriles 2-4, concentraciones de fago λ de 10, 30 y 50 ng/ μ L; carriles 5-8, aislados 257CCV, 243ACV, 88CCV y A15CV. **17F:** carril 1, pb; carriles 2-4, concentraciones de fago λ de 10, 30 y 50 ng/ μ L; carriles 5-7, aislados 2ACV, 103BCV y 27DCV. **17G:** carril 1, pb; carriles 2-6, concentraciones de fago λ de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L; carriles 7-8, aislados 233ACV y 202BCV.

Edición y comparación de secuencias. Una vez obtenidos los electroferogramas, como se muestra en la figura 18, éstos fueron editados y guardados en formato FASTA (Cuadro 4). Además, para confrontar la identidad de cada uno de los aislados, se comparó la identidad fenotípica contra la molecular, utilizando el algoritmo BLAST, y se mostró que en 69 aislados, hubo una gran correlación entre su identidad fenotípica y su identidad molecular, como lo muestran los valores de % de similitud, valor de expectación y % de identidad (Cuadro 5). Mientras que, sólo 20 aislados no mostraron esta correlación. Sin embargo, aunque no hubo una correlación entre la identidad fenotípica y la identidad molecular a nivel de especie en estos aislados, sí existe una relación taxonómica en lo que se refiere a la pertenencia a nivel de "Sección", ya que 15 aislados identificados fenotípicamente como *A. flavus*, y como *A. oryzae* a nivel molecular, ambas especies forman parte de la Sección *Flavi*. Por otro lado, los aislados 343BCV, 283ACV 237BCV y 369BHJ fueron identificados fenotípicamente sólo a nivel de género como *Aspergillus* sp., sin embargo a nivel molecular, los dos primeros fueron identificados como *A. calidoustus*; el aislado

237BCV fue identificado como *A. niger* y el aislado 369BHJ fue identificado como *A. flavus*. Mientras que el aislado 237CCV, identificado fenotípicamente como *A. terreus*, a nivel molecular estuvo asociado con *A. oryzae*.

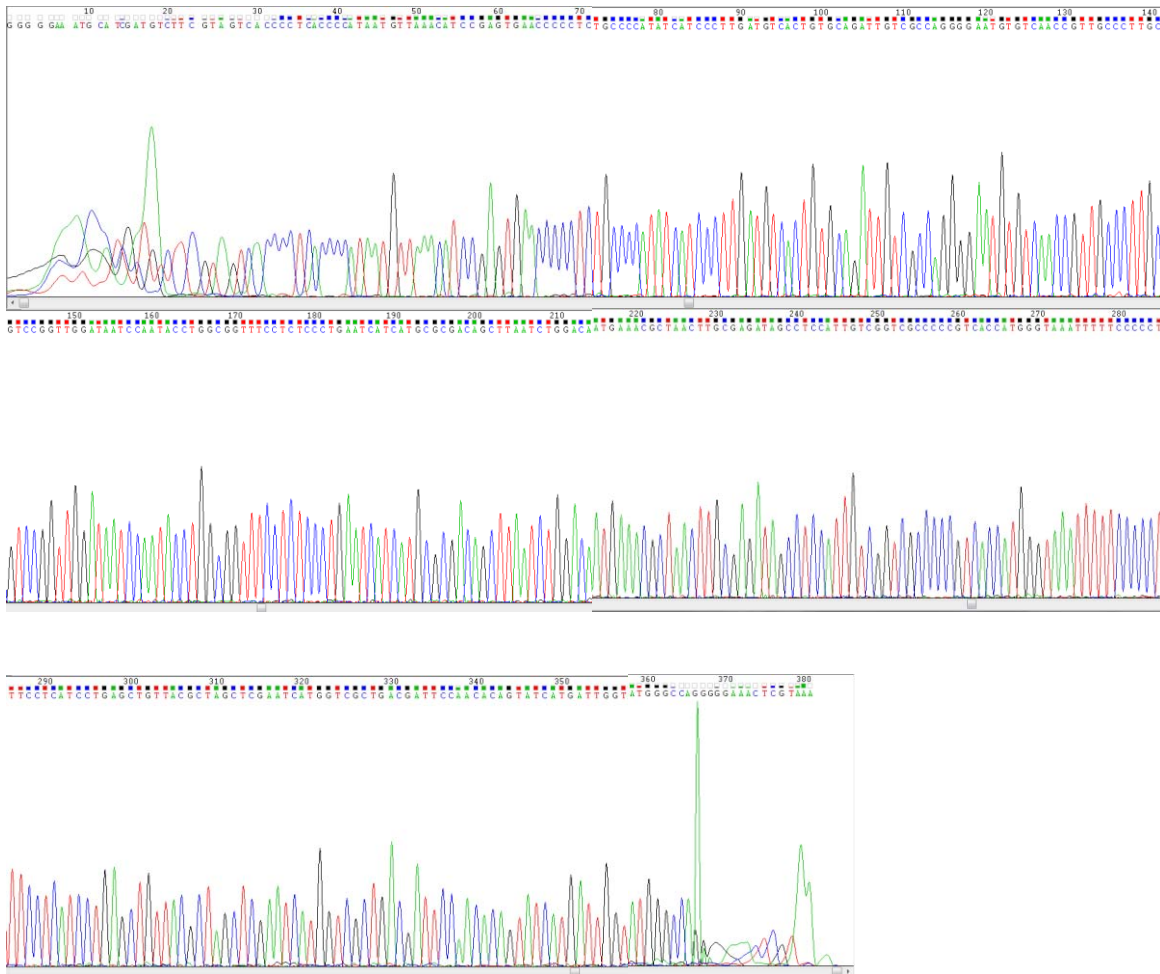


Figura 18. Ejemplo de un electroferograma, correspondiente al amplicón secuenciado con el gene de actina del aislado 9ACV.

Cuadro 6. Secuencias en formato FASTA de todos los aislados incluidos en el estudio

>103BCV

```
AGCCGGTTTTGCGCGGTGATGATGCAATGTGCAAGGGCGGTTTTGGCGGGTAAAGATACTCTTCGTAC
NGTCTTACAGTAAAGTCAACCCCCCTCCTTGTCCACTGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGG
ATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCATTGCGTCTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGT
GGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAGTTCGAATAGTGAACATACTTGCAGTACAGCCT
CCATTGTCGGTCGTCCCCGTACCCATGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCTA
GGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGG
```

>100AHJ

```
GGCGGTTTTGCGCGGGGATGGGGCATCCATTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCCCTACCCCATAAATG
TTAAACATCCGAGTGAACCCCCCTGCCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCAGATTGTGCGCC
AGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGGTTTTCTCTC
CCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCAGATAGCCTCCAT
TGTCGGTCGCCCCGTACCCATGGGTAAATTTCCCCCTTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTAG
CTCGAATCATGGTCGCTGACGATCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGG
```

>146AHJ

```
TTAATGTGCAATAAGGGGTTTTGCGCGGTAACGATGATATCTTCGTAGTCTTCCGTAAGTCAACCCC
CTCCTTGTCCACTGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGC
AATTGCCACCCATTGCGTCTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCA
TGTCAGCACCAGTTCGAATAGTGAACATACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCA
CCATGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCT
AAGNTGCCGCCACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGGAACTCGTAA
```

>140AHJ

```
GCAAGGCCGGTTTTGCGCGGTGACGAATTTCTGCTTCTGTGCTTGCCTAGTGCACCAATCCATTGT
CCACTGTGCTGGACGTCCTACCTACTGGCTTGATGGGTTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCA
CCCATTGCGTCTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCA
CCAGTTCGAATAGTGAACATACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTACCCATGGGT
AAAGCTCCCCTTTGTTCTCCCCTAATTGGCCTGCTAGCCTGGGTGATCAGTTCGTGTCTAATGCC
GCCACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAA
```

>176ACV

```
AAGGGCGGTTTTGCGCGGTGAGGATGGCGTCCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCAC
CCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCCCTGCCCCATATCATCCCTTGATGTCACT
GTGCAGATTGTGCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCC
AATACCTGGCGGTTTTCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGA
AACGCTAACTTGCAGATAGCCTCCATTGTCGGTCGCCCCGTACCCATGGGTAAATTTTC
CCCCCTTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTAGCTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCC
AACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGG
```

>166ACV

```
AATGTGCAAGGCCGGTTTTGCGGGGAGTTAATTTCTTCTTCTATCATCTTCCGTAAGTCAACCTCCTC
CTTGTCCACTGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAAT
TGCCACCCATTGCGTCTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGT
CCGCACCAGTTCGAATAGTGAACATACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTACCA
TGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAAT
GCCTCCCACAGTATCATGATAGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAAGATGGGCCAGAGCTCAAAAC
```

>202BCV

```
GACTGATCTTGTGCGCGTGTTCGTAGTCACCCCTCTCCTTGTCCACTGTGCTGGACGTCCTACCTAC
TGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCTATTGCGTCTTCGCGCCGGGCTG
CTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAGTTCGAATAGTGAACATACTTGC
CGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTACCCATGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTCTCCCCCTAA
```

TTGGCCTGCTAGGCTGGGTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCACAGTATCATGATTGGTATGGGC
CAGAAGGGACTCGTAA

>217ACV

GGGCGTTTTCGCCGGTGAGGATGGGTTCGGTGGCTTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCCTTGTCCAC
TGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCA
TTGCGTCTTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAG
TTCGAATAGTGAACATACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTACCATTGGGTAAAG
CTCCCCTTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCAC
AGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGACTCGTAA

>219ACV

AATGTGCAAGGGCGTTTTCGCCGGTGAGCCTGGTTTTCTGTGCCGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTC
CTTGTCCACTGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAAT
TGCCACCCATTGCGTCTTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGT
CAGCACCAGTTCGAATAGTGAACATACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTACCA
TGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAAT
GCCGCCACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGACTCGTAA

>220ACV

GGGGTTTTCGCCGGTGACGGTAAATTTCCGTGGCGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCCTTGTCCACT
GTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCAT
TGCGTCTTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAGT
TCGAATAGTGAACATACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTACCATTGGGTAAAGC
TCCCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCACA
GTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGGACTCGTAA

>222ACV

TAATGTGCAAGGCCGGTTTTCGCCGACATGTCTGTTTTCGCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTC
ACCCATAATGTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGC
AGATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGC
GGTTTTCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCGAG
ATAGCCTCCATTGTCGGTCGCCCCCGTACCATTGGGTAAATTTTCCCCCTTCTCATCCTGAGC
TGTTACGCTAGCTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAG
GGG

>233ACV

GCCGGTTTTCGCCGGTGATGCTTATGTCTGAGGCGTCTTCCGTAATCCAACCCCTCACCCATAATG
TTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCAGATTGTGCGC
AGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGTTTTCTCTC
CCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCGAGATAGCCTCCAT
TGTCGGTCGCCCCCGTACCATTGGGTAAATTTTCCCCCTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTA
GCTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGGACTCGT
AAA

>235ACV

GGGGTTTTCGCCGGGATGGCGGTGGTCATGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCACCCATAATGT
TAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCAGATTGTGCGCA
GGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGTTTTCTCTCC
CTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCGAGATAGCCTCCAT
TGTCGGTCGCCCCCGTACCATTGGGTAAATTTTCCCCCTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTAG
CTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGG

>237BCV

GAAATTGGGTTCTGTCCATTGCTAGTCAAGTCAACCCCTCCTTGTCCACTGTGCTGGACGTTCTA
CCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCATTGCGTCTTTCGCGCCG
GGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAGTTCGAATAGTGAACATA
ACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTACCATTGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTCTCT
CCTAATTGGCCTGCTAGGCGGTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCACAGTATCATGATTGG

TATGGGCCAGAGGATCGTAAGTAA

>237CCV

GCATGTTTCTGGCGTGATCGTAGTCACCCCCGCAATAGCCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGT
CATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATTTGCTGTGTTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTTGG
ATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCATGATGAATTCAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCC
TCCATTGTCGGTCTCCCCGTCATCATGGGTAAATATCCTCCGATTCTCCCAGCTAGCTACTCCAG
AGCGATAGCCACTGACGATGTATCAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGGACTCGTAAA

>243ACV

ATGTGCAAGGCCGGTTGCGCCGGTGATAATCTATTATATGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCCCTCC
TTGTCCACTGTGCTGGACGTTTACTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATT
GCCACCCATTGCGTCTTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTC
AGCACCAGTTGGAATAGTGAACCTAATTGCGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCTCCCCGTCACCAT
GGGTAAAGCTCCCCTTTGTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATG
CCGCCACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGGACTCGTAA

>24BCV

GCAAGGCCGGTTTCGCGGAGAAGATGCCCTGTTTCTCTTCTGTCTTTCGTAAGTCAACCCCCGCAAT
AGCCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATTTGCTG
TGTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCATGATG
AATTCAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTCGGTCTCCCCGTCATCATGGGTAAATAT
CCTCCGATTCTCCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGACGATGTATCAGTATCATGATTG
GTATGGGCCAGAGGGACTCGTAA

>24CCV

ATGTGCAAGGCCGGTTTCGCGGGTGACGGTGCTACCTGTGCCGTCTTCCGTAATCCAACCCCCCTCC
TCATATCCGCTGTGCTGGATATCCTTCTCCTGGCTTGATGGGTTCTTCCCACTCTTCATAGCAAT
TGCCACCCATTGCGTCTTTCGCGTGGGTTGTTAGCTTATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGTCATGT
TAGCACCGGTTGGAATAGTCAACTAATTGCGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCTCCCCGTCACCA
TGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTCGCCAAGTTGGCCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTATCTAAT
GCCGCCGCGAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGGACTCGTAA

>24DCV

ATGTGCAAGGCCGGTTTCGGGAGTGACAATTGGTGTTCTTCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCCGCG
AATAGCCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATTTG
CTGTGTTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCATG
ATGAATTCAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTCGGTCTCCCCGTCATCATGGGTAAA
TATCCTCCGATTCTCCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGACGATGTATCAGTATCATGA
TTGGTATGGGCCAGAAGGGACTCGTAA

>250AHJ

GGTTTCGCCGGTGACATGGCTGTGTAGCGCTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCCTTGTCCACTGTG
CTGGACGTTTACTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCATTGC
GCTTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAGTTCCG
AATAGTGAACCTAATTGCGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCTCCCCGTCACCATGGGTAAAGCTCC
CCTTGTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCACACAGT
ATCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGAACCTCGTAA

>257CCV

GGTTTCGCCGGTGATGGGGCACTCCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCACCCATAATGTTA
AACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCCTGTGCGAGATTGTCGCCAGG
GGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGGTTTCTCTCCCT
GAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAAATGAAACGCTAATTGCGAGATAGCCTCCATTG
TCGGTCGCCCCGTCACCATGGGTAAATTTTTCCCCCTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTAGCT
CGAATCATGGTCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCANGGGAA

>262AHJ

GGGGTTTTCCCGGTGATGAAGGTCCTCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCACCCATAATG

TTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCAGATTGTCGCC
AGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGGTTTCTCTC
CCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGGGAGATAGCCTCCAT
TGTCGGTCGCCCCGTCACCATGGGTAAATTTTCCCCCTTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTAG
CTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGG

>264AHJ

AACCTTTTATCTTTTTTTGTNNCGTAGTCACCCCTCCTTGTCCTACTGTGCTGGACGTTCTACCT
ACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCATTGCGTCTTCGCGCCGGGC
TGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTGAGCACCAGTTTGAATAGTGAACACT
TGCGGTACAGCCTCCATTGTGCGTTCGTCACCATGGGTAAAGCTCCCTTTGTTCTCTCCT
AATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCACAGTATCATGATTGGTATGG
GCCAGAGGGGACTCGTAA

>270BHJ

GGTTTCGCCGGTGGTGTGATGCTTTTCGTGCTGCTGTCTTCGTAGTCACCCCTCACCCATAATGTTA
AACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCAGATTGTCGCCAGG
GGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGGTTTCTCTCCCT
GAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGGGAGATAGCCTCCATTGT
CGGTGCCCCCGTCACCATGGGTAAATTTTCCCCCTTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTAGCTC
GAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGAACTCGTAA

>27DCV

CGAGTATGTGCAAGGCCGGTTTCGCCGGTGACGATGCGCCTGGTTCTGTTGCCCTTCGTAGTCACCC
CCCGCAATAGCCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCC
ATTTGCTGTGTTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACA
TCATGATGAATTCAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTCGGTCGTCACCGTCATCATGG
GTAAATATCCTCCGATTCTCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGACGATGTATCAGTAT
CATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAA

>281CCV

GGGTTTCGCCGGTGACGATGCTGTCCGTGACGCTTTCGTAAGTCAACCCCTCCTTGTCCACTG
TGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCATT
GCGTCTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAGTT
CGAATAGTGAACACTTGGCGTACAGCCTCCATTGTGCGTTCGTCACCATGGGTAAAGCT
CCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCACAG
TATCATGATTGGTATGGGCCAAGGAACTCGTAA

>283ACV

GGTTTCGCCGGTGAGGATGGCCAGGGCGCCGCTTTTCGTAAGTTGAACCCCTCAATGCTTTACTACA
CGGACCCCTGTACCCCTCAGTACTGCCTTCTATTACTCTGCCATCGAGTACACTTGATGAAGTTTG
TCGGCTGTTTTCTGCGCCGACGGGCACACCAGGGCGGTGAAGACCCCGTCTCACCCACCCA
CTCATACTGCCATCTCCACAATCCGGATGCTAACCGTCGCGCGCAGCCTCCATTGTGCGTCTCC
CCGTCACCATGGGTAAATCCTTCCCAATGAGTTGTCCATCAATGGATGGTGGCCGCTGACTATT
GAAATAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGGAATTTCGTA

>284BCV

ATGTGCAAGGCCGGTTTCGCCGGGACAATGTTCTCTATGCCGTTCTTCGTAAGTCAACCCCTCC
TTGTCCACTGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATT
GCCACCCATTGCGTCTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTC
AGCACCAGTTTGAATAGTGAACACTTGGCGTACAGCCTCCATTGTGCGTCTCCCGTCACCAT
GGGTAAAGCTCCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATG
CCGCCACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAA

>2ACV

CCGGGATGGCTGGTCTCCGTTCTATCTTCGTTAAGTCAACCCCTCCTTGTCCACTGTGCTGGACG
TTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCATTGCGTCTTCG
CGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAGTTTGAATAGTG
AACTAACTTGGCGTACAGCCTCCATTGTGCGTTCGTCACCATGGGTAAAGCTCCCTTTGT

TCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCACAGTATCATGAT
TGGTATGGGCCAGGGGAAATTCGTAAA

>307ACV

ATCAATGTGCAATTCGGTTTTGCGCCGGTGACGGTGCCCATCATGTCTTCGTCCGTAAGTCAACCCCC
TCCTCATATCCGCTGTGCTGGATATCCTTCTCCTGGCTTGATGGGTTCTTCCACTCTTCATAGC
AATTGCCACCCATTGCGTCTTGGCTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGTCA
TGTTAGCACCGGTTGGAATAGTCAACTAACCTGCGGTACAGCCTCCATTGTTCGGTTCGTCCTCCCGTCA
CCATGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTTCCCCCAAGTTGGCCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTATCT
AATGCCGCCCGCAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGGACTCGTAAGG

>312AHJ

TATGTGCAAAGCCGGTTTTGCGCGTGGCGATGCCCCCGCGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCCCG
CAATAGCCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATTT
GCTGTGTTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCAT
GATGAATTCAGTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTTCGGTTCGTCCTCCCGTTCATCATGGGTAA
ATATCCTCCGATTCCTCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGTACGATGTTATCAGTATCA
TGATTGGTATGGGCCAGGGGGACTCGTAA

>312BHJ

ATGTGCAAAGGCGGTTTTGCGCCGGTGATGATGGTTCTTGTGTCTTCGTCCGTAAGTCAACCCCTCAC
CCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCCATATCATCCCTTGATGTCAGTGTGCAG
ATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGGCGTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGG
TTTCCCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGGGAGAT
AGCCTCCATTGTCGGTTCGCCCCGTACCATTGGGTAAATTTTCCCCCTTTCTCATCCTGAGCTG
TTACGCTAGCTCGAGATCATGGTTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGA
GGGACTCGTAA

>314AHJ

GGCGGTTTCGCCGGTGATGGGGGTCTCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCACCCATAATG
TTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCCATATCATCCCTTGATGTCAGTGTGCAGATTGTGCC
AGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGGCGTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGGTTTTCTCTC
CCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGGGAGATAGCCTCCAT
TGTCGGTTCGCCCCGTACCATTGGGTAAATTTTCCCCCTTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTAG
CTCGAATCATGGTTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAGAAACTCGTA
A

>314BCV

ATGTGCAAAGGCGGTTTTGCGCCGGTGACGACTTTAGTTCTGTTTCGTCTTCGTAAGTCAACCCCTCC
TCATATCCGCTGTGCTGGATATCCTTCTCCTGGCTTGATGGGTTCTTCCACTCTTCATAGCAAT
TGCCACCCATTGCGTCTTGGCTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGTCATGT
TAGCACCGGTTGGAATAGTCAACTAACCTGCGGTACAGCCTCCATTGTTCGGTTCGTCCTCCCGTCA
TGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTTCCCCCAAGTTGGCCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTATCTAAT
GCCGCCCGCAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGGACTCGTAA

>316AHJ

CAAGGCCGGTTTTGCTGCAAGTAATACCCTGCGCGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCCGCAATAG
CCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATTTGCTGTG
TTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCATGATGAA
TTCAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTTCGGTTCGTCCTCCCGTTCATCATGGGTAAATATCC
TCCGATTCCTCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGACGATGTATCAGTATCATGATTGGT
ATGGGCCAGAGGGGACTCGTA

>31CCV

TAATGTGCAAAGGCGGTTTTGCGCCGGTGACGATTGGGGCTGTATCGCGTCTTCGTAGTCAACCCCT
CCTCATATCCGCTGTGCTGGATATCCTTCTCCTGGCTTGATGGGTTCTTCCACTCTTCATAGCA
ATTGCCACCCATTGCGTCTTGGCTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGTCAT
GTTAGCACCGGTTGGAATAGTCAACTAACCTGCGGTACAGCCTCCATTGTTCGGTTCGTCCTCCCGTCA
CATGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTTCCCCCAAGTTGGCCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTATCTA

ATGCCGCCCGCAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGGMCTCGTAA

>323CHJ

TTTATGTGCAAGGCCGGTTTTCGCCGGTGACCTGGTTACTCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCC
CGCAATAGCCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCAT
TTGCTGTGTTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATC
ATGATGAATTCAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCATCATGGGT
AAATATCCTCCGATTCTCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGTACGATGTATCAGTATC
ATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAA

>335BCV

AATGTGCAAGGGGCGGTTTTCGCCGTAGACTGTTTTTATTGTGTTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCCCT
CCTCATATCCGCTGTGCTGGATATCCTTCCCTCTGGCTTGATGGGTTCTTCCCACCTTTCATAGCA
ATTGCCACCCATTGCGTCTTTGCGCTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGTCAT
GTTAGCACCGGTTGCAATAGTCAACTAACCTGCGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCAC
CATGGGTAAAGCTCCCCTTTTGTTTCCCCCAAGTTGGCCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTTATCTA
NNCNATGCCGCCCGCAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGGACTCGTAA

>343BCV

TTTATGGCCAAAAGCGGTTTTCGCCGGTGGGGGGGAAACTAACCTAACCTTCGTAAGTTGAACCCCT
CAATGCTTTACTACACGGACCCCTGTACCCCTCAGTACTGCCTTCATTACTCCTGCCATCGAGTAC
ACTTGATGAAGTTGTGCGGCTGTTTTCTGCGCCGACGCGGGCACACCCAGGGCGGTGAAGACCCC
CGTCTCACCCACCCACTCATACTGCCATCTCCACAATCCGGATGCTAACCGTCGCCGCGCAGCCTC
CATTGTGCGGTGTCCTCCCGTCACCATGGGTAAATCCTTCCCCAATGAGTTGTCCATCAATTGGATGG
TGGCCGCTGACTATTGAAATAGTATCATGATTGGTATGGGCCAAGGGGAACCTCCGTAA

>360BHJ

TTATGTGCAAGGCCGGTTTTCGCCGGTGAGCTTGCTATCTGCGCCGTCCTTCCGTAAGTCAACCCCCCTC
CTCATATCCGCTGTGCTGGATATCCTTCCCTCTGGCTTGATGGGTTCTTCCCACCTTTCATAGCAA
TTGCCACCCATTGCGTCTTTGCGCTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGTCATG
TTAGCACCGGTTGCAATAGTCAACTAACTTGCGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCACC
ATGGGTAAAGCTCCCCTTTTGTTTCCCCCAAGTTGGCCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTTATCTAA
TGCCGCCCGCAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGGACTCGTAA

>369BHJ

TATTGTGCAAGGCCGGTTTTCGCCGGTGAGGATGTGTTTTGTGGCGTCTTCCGTAAGTCAACCCCC
GCAATAGCCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATT
TGCTGTGTTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCA
TGATGAATTCAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCATCATGGGTA
AAATATCCTCCGATTCTCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGACGATGTATCAGTATCAT
GATTGGTATGGGCCAGAGGGGACTCGTA

>370BHJ

TAATGTGCAAGGCCGGTTTTCGCCGGTGATCATAATTTATTTTTTCGTCTTCCGTAAGTCAACCCCC
GCAATAGCCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATT
TGCTGTGTTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCA
TGATGAATTCAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCATCATGGGTA
AAATATCCTCCGATTCTCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGACGATGTATCAGTATCAT
GATTGGTATGGGCCAGAGGGGACTCGTAA

>373AHJ

ATGTGCAAAGGCCGGTTTTCGCCGGTGACGAGTCTGTTTTCTGTGCTCTTCCGTAAGTCAACCCCCCTCC
TTGTCCACTGTGCTGGACGTTTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATT
GCCACCCATTGCGTCTTCCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTC
AGCACCAGTTGCAATAGTGAACCTAATTGCGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCACCAT
GGGTAAAGCTCCCCTTTTGTTATCCCCAATTGGCCTGCCAGGCTGGGTGATCAGTTTTGTCTAATG
CCGCCACGAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAA

>373CHJ

TTTATGTGCAAGCCGGTTTCGCCGGTGAGCCTGTTGTTTGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTC
ACCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGC
AGATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGC
GGTTTCCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCGAG
ATAGCCTCCATTGTCGGTCCGCCCCGTACCATGGGTAAATTTTCCCCCTTTCCCTCATCCTGAGC
TGTTACGCTAGCTCGAATCATGGTCGCTGAGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCC
AGAAGGGGACTCGTAA

>381DCV

CCGGTGAGGATTGGCCGGGGAGCGTTCTTCGTAAGTCAACCCCTCCTCATGTCCACTGTGCTGGA
CGTTCACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCATTGCGTCTT
CGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAGTTGGAATAG
TGAACAACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCCGCCCCGTACCATGGGTAAAGCTCCCCCTT
GTTCCTCCTAATTGGCCTGTTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGGCGCCACAGTATCATG
ATTGGTATGGGCCAGAGGGGACTCGTAA

>385BHJ

ATTTATGTGCAAGCCGGTTTCGCCGGTGATGATGCTCCCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCC
TCACCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGT
GCAGATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTG
GCGTTTTCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCG
AGATAGCCTCCATTGTCGGTCCGCCCCGTACCATGGGTAAATTTTCCCCCTTTCCCTCATCCTGA
GCTGTTACGCTAGCTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCC
AGAAGGGACTCGTAA

>387AHJ

TTATGTGCAAAGCCGGTTTCGCCGGTGCGGATGGTTTCCATCGCGTCTTCCGTAAGTCAACCCCT
CCTCATATCCGCTGTGCTGGATATCCTTCCCTCTGGCTTGATGGGTCTTCCCCTCTTCATAGCA
ATTGCCACCCATTGCGTCTTGCCTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGCGGTGAATTACCCGTCAT
GTTAGCACCGGTTGGAATAGTCAACTAACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCCGCCCCGTAC
CATGGGTAAAGCTCCCCCTTGTTCCTCCCAAGTTGGCCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTATCTA
ATGCCGCNACCGCAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGGACTCGTAA

>392AHJ

TTATGTGCAAAGCCGGTTTCGCCGGTACCCAAGGGCTGTGCGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTC
ACCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGC
AGATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGC
GGTTTCCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCGAG
ATAGCCTCCATTGTCGGTCCGCCCCGTACCATGGGTAAATTTTCCCCCTTTCCCTCATCCTGAGC
TGTTACGCTAGCTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAG
GGTACTCGTAAT

>394AHJ

TATGTGCAAAGCCGGTTTCGCCGGTGAGGGTGTCCACTCGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCA
CCCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCA
GATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCG
GTTTCCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCGAGA
TAGCCTCCATTGTCGGTCCGCCCCGTACCATGGGTAAATTTTCCCCCTTTCCCTCATCCTGAGCT
GTTACGCTAGCTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCA

>395AHJ

ATGTGCAAAGCCGGTTTCGCCGGTGACGTTGGTCTATGTATCATTTTTGTGTAAAGTCGACCCCCC
TCCTTGTCCACTGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCA
ATTGCCACCCATTGCGTCTTGCAGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCAT
GTCAGCACCAGTTCGAATAGTGAACAACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCCGCCCCGTAC
CATGGGTAAAGCTCCCCCTTGTTCCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTA
ATGCCGCCACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAA

>411AHJ

TTATGTGCAAGCCGGTTTTCGCCGGTGATGATGCTCCCTGTGTTGTCGGCTCGTAGTCAACCCCTCA
CCCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCAGTGTGCA
GATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCGTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCG
GTTTCCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCAGAG
TAGCCTCCATTGTCGGTGCACCCCGTCACCATGGGTAAATTTCCCCCCTTTTCCTCATCCTGAGC
TGTTACGCTAGCTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAG
AGGGACTCGTAA

>412AHJ

TTATGTGCAAGCCGGTTTTCNCCGGTGACGGTCTTTTCCGTTCCCTTAGTAGACGAACCCAAT
CCTTGTCCACTGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAA
TTGCCACCCATTGCGTCTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCATG
TCAGCACCAGTTCGAATAGTGAACAACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCCCGTCCCGTACC
ATGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCCAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAA
TGCCGCCACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAA

>435AHJ

TATGTGCAAGGCCGGTTTTCGCCGGGGATGGCGGTGATCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCA
CCCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCAGTGTGCA
GATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCGTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCG
GTTTCCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCAGAG
TAGCCTCCATTGTCGGTGCACCCCGTCACCATGGGTAAATTTCCCCCCTTTTCCTCATCCTGAGCT
GTTACGCTAGCTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGA
GGGACTCGTAA

>50CHJ

CGGTTTTGCCTTTTATCATTATCCTGTGTCGTTCCGTAAGTCAACCCCTCCTTGTCCACTGT
GCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCATTG
CGTCTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAGTTC
GAATAGTGAACAACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCCCGTCCCGTACCATGGGTAAAGCTC
CCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCACAGT
ATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAA

>55CHJ

AATGTGCAAGGCCGGTTTTCGCCGGTGCCCTCGGTGGCGTCTTCCGTAAGTCAACCCCC
GCAATAGCCTGATACATACCCCTCCCGACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATT
TGCTGTGTTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCA
TGATGAATTGAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTCGGTCCCGTCCCGTCCCGTCCCGT
AATATCCTCCGATTCTCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGTACGATGTATCAGTATCA
TGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAA

>55DHJ

ATGTGCAAGGCCGGTTTTCGCCGGTGACGTAGCCTGTCGATGCGTCTTCCGTAAGTCAATCCCCCTC
CCCCACCAGTTTACCGGACTACCCCTCCCGACCCCTCGTGATGGCCACCCCTCTGCAAGGCATGC
TTTCATAGCTCCCTTGCAATTGAGTTGGCATTATTGCGGGGGAGGAGAGCGGGCGGTGAATCGCCTC
CCCTTTCTGCCATCATTCTAGGATACTAACCATTGCCTACAGCCTCCATTGTCGGTCCCGTCCCGT
ACCATGGGTAAAGCTTCCCTTTTCAATCCGAAATGGGCTTCCATGAATCTAATGAATTGCGAGTA
TCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGACTCGT

>57BHJ

TAGGCAAGCCGGTTTTCGCCGGTGATGATGCTACCCCGGGTGTTTATGTGCAAGGGCGGTTTTCGCC
GTGACGATGGCCTGTTTGCTGGTGTCTTCGTAGTACCCCCGCAATAGCCTGATACATACCCCTC
CCGACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATTGCTGTGTTCTCGCAGTAAATAAG
CACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCATGATGAATTCAGTTTACTGACCTG
AACCTTAGCCTCCATTGTCGGTCCCGTCCCGTCCCGTCCCGTCCCGTCCCGTCCCGTCCCGTCCCGT
GCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGACGANCTGTATCAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGGAC
TCGTAA

>87ACV

CGGTTTCGCCGGTGACGATGCCCCCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCCGCAATAGCCTGAT
ACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATTTGCTGTGTTCTCG
CAGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCATGATGAATTCAGT
TTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTGCGGTCGTCCCCGTCATCATGGGTAAATATCCTCCGAT
TCTCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGTACGATGTATCAGTATCATGATTGGTATGGG
CCAGGGGGACTCGTAAACG

>87BHJ

TTATGTGCAAAGGCGGTTTCGCCGGTGGGGATAGTCTCTGTATCGCGTCTTCGTAGTCAACCCCT
CCTCATATCCGCTGTGCTGGATATCCTTCCCTGGCTTGATGGGTTCTTCCCACCTTTCATAGCA
ATTGCCACCCATTGCGTCCTTGGCTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGCGGTGAATTACCCGTCAT
GTTAGCACCCGTTTGAATAGTCAACTAACTTGGGTTACAGCCTCCATTGTGCGTTCGTCCCCGTCAC
CATGGGTAAAGCTCCCCTTTGTTTCCCCAAGTTGGCCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTTATCTA
ATGCCGCCCGCAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGGGACTCGTAAA

>88CCV

GGCGGTTTCGCCGGTGACAATGGCTCCTCTAGCGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCCTTGTCCACT
GTGCTGGACGTTTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCAT
TGCGTCTTCGCCGGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAGT
TCGAATAGTGAACCTAATTGGGTTACAGCCTCCATTGTGCGGTCGTCCCCGTCACCATGGGTAAAGC
TCCCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTTGTCTAATGCCGCCATC
AGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGGGACTCGTAAA

>88CHJ

GCCGGTATAGGGGCTCTCGTGCCGCTTTCGTAAGTCAACCCCTCCTCATATCCGCTGTGCTGG
ATATCCTTCCCTGGCTTGATGGGTTCTTCCCACCTTTCATAGCAATTGCCACCCATTGCGTCTT
TGCGTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGCGGTGAATTACCCGTCATGTTAGCACCCGTTTGAATAG
TCAACTAACTTGGGTTACAGCCTCCATTGTGCGTTCGTCCCCGTCACCATGGGTAAAGCTCCCCTTT
GTTTCCCCAAGTTGGCCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTTATCAAATGCCGCCCGCAGGATCATG
ATTGGGATGGGCCAGAAGGACTCGTAAA

>9ACV

TTATGTGCAAAGGCGGTTTCGCCGGGGGTGATGCATCCCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTC
ACCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCG
AGATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGGCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGC
GGTTTCCCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGGCAG
ATAGCCTCCATTGTGCGTCCGCCCGTCACCATGGGTAAATTTTTCCCCCTTTCCTCATCCTGAGC
TGTTACGCTAGCTCGAATCATGGTTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAG
GGG

>A10CV

ATGTGCAAAGCCGGTTTCGCCGGTGATGAGGTGTGTATCGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCAC
CCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCGAG
ATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGGCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGG
TTTCCCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGGCAGAT
AGCCTCCATTGTGCGTCCGCCCGTCACCATGGGTAAATTTTTCCCCCTTTCCTCATCCTGAGCTG
TTACGCTAGCTCGAATCATGGTTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAA
GG

>A13CV

AAAGGGGGGTTTCGCCGGTGGCGATGCTCATCGTGACGCTTTCGTAAGTCAACCCCTCCTTGTG
CACTGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCCTCTTTTCATGGCAATTGCCAC
CCATTGCGTCTTCGCCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCAC
CAGTTTGAATAGTGAACCTAACTTGGGTTACAGCCTCCATTGTGCGTTCGTCCCCGTCACCATGGGT
AAGCTCCCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTTGTCTAATGCCGCC
CACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGATGAACTCGTAATC

>A15CV

AATGTGCAAGGGCGGTTTTCGCCGGTGACGATGCCGCTAGTGGAGTCTTCCGTAAGTCAACCCCCG
CAATAGCCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATTT
GCTGTGTTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCAT
GATGAATTCAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTTCGGTTCGTCGCCCGTCATCATGGGTAA
ATATCCTCCGATTCTCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGACAATGTATCAGTATCATG
ATTGGTATGGGCCAAAAGGACTCGTAAAA

>A17CV

GTATGTGCAAAGCCGGTTTTCGCCGGTGACGATGCCGCTGCGTGCTGTTCGTCGGGTAGTCGACCTCCC
GCAATAGCCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATT
TGCTGTGTTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCA
TGATGAATTCAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTTCGGTTCGTCGCCCGTCATCATGGGTAA
AATATCCTCCGATTCTCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGGATAGCCACCTGACGATGTATCAGTATC
ATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAAAA

>A25CV

GGTTTCGCGGGGGGCTATGATCGCCGTGCCGCTTCCGTAAGTCAACCCCTCCTCATATCCGCTG
TGCTGGATATCCTTCCTCCTGGCTTGATGGGTCTTCCCACTCTTCATAGCAATTGCCACCCATTG
CGTCCCTTGCCTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGCGGTGAATTACCCGTCATGTTAGCACCGGTTT
GAATAGTCAACTAATTTGCGGTACAGCCTCCATTGTTCGGTTCGTCGCCCGTCACCATGGGTAAAGT
CCCTTTGTTTCCCCAAGTTGGCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTATCTAATGCCGCCCGCAGT
ATCATGATTGGTATGGGCCAGGGGACTCGTAAAG

>A26CV

AGCCGGTTTTCGCCGGTGCCTAGGGTTCCCGTATTCGCTTTTCGTAAGTCAACCCCTCCTTGTCCAC
TGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCA
TTGCGTCTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCG
TTCGAATAGTGAACAACTTGCCTGACAGCCTCCATTGTTCGGTTCGTCGCCCGTCACCATGGGTAAAG
CTCCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCAC
AGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGGAACTCGTAA

>A28CV

TATGTGCAAAGGGCGGTTTTCGCCTGGGGTGATGCTCCCCGCGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTC
ACCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGC
AGATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGC
GGTTTCCCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCAG
ATAGCCTCCATTGTTCGGTTCGCCCGTCACCATGGGTAAATTTTTCCCTTTCTCATCCTGAGC
TGTTACGCTAGCTCGAATCATGGTTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAG
AGG

>A35CV

ATGTGCAAGGCCGGTTTTCGCCGATCATTGGTTTTGTATCGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCAC
CCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCAG
ATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGG
TTTCCCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCAGAT
AGCCTCCATTGTTCGGTTCGCCCGTCACCATGGGTAAATTTTTCCCTTTCTCATCCTGAGCTG
TTACGCTAGCTCGAATCATGGTTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGG
G

>A36CV

GGTTTCGCCGGTGGTGGGGCGCCCTGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCACCCATAATGTTA
AACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCAGATTGTGCCAGG
GGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGGTTTTCTCTCCCT
GAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCAGATAGCCTCCATTGT
CGGTCGCCCGGTCACCATGGGTAAATTTTTCCCTTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTAGCTC
GAATCATGGTTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGGAAACTCGTAA

>A38CV

GGTTTCGCCGGTGTGATAAGTCTCGCTTTGTTTTCCGTAAGTCAACCCCCGCAATAGCCTGATA
CATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATTTGCTGTGTTCTCGC
AGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCATGATGAATTCAGTT
TACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCATCATGGGTAAATATCCTCCGATT
CTCCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGATCGATGTATCAGTATCATGATTGGTATGGGC
CAGGGGAACCTCGTAAA

>A39CV

GGTTTCGCCGGTGAGCGTGCTCCCCGTGCTGCTTCCGTAAGTCAACCCCTCCTCATATCCGCTG
TGCTGGATATCCTTCCCTCCTGGCTTGATGGGTTCTTCCCACTCTTCATAGCAATTGCCACCCATTG
CGTCCTTGCGCTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGCGGTGAATTACCCGTCATGTTAGCACCGGTTT
GAATAGTCAACTAATTGCGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCACCATGGGTAAAGCTC
CCCTTTGTTTTCCCCAAGTTGGCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTATCTAATGCCGCCCGCAGT
ATCATGATTGGTATGGGCCAGGGGACTCGTAAAG

>A40CV

TAATGTGCAAGGCCGGTTTTGCCGGTGGTGGGGACCTCTTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCC
GCAATAGCCTGATACATACCCCTCCCGCACCCGTCATCCCTCTCCAAGTCTTTAGGTATAGCCATT
TGCTGTGTTCTCGCAGTAAATAAGCACCATTTGGATGGATCAGCTGTGACGCGTGGCCCCACATCA
TGATGAATTCAGTTTACTGACCTGAACCTTAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCATCATGGGTA
AATATCCTCCGATTTCTCCAGCTAGCTACTCCAGAGCGATAGCCACTGACGATGTATCAGTATCAT
GATTGGTATGGGCCAGAGGGAACCTCGTAAA

>B11HJ

GGCGGTTTTGCCGGTGGGGATGTATCCCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCACCCATAATG
TTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCAGATTGTGCGC
AGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCGTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGGTTTTCTCTC
CCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGGGAGATAGCCTCCAT
TGTCGGTCGCCCCGTCACCATGGGTAAATTTTTCCCCCTTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTAG
CTACGAATCATGGTCGCTGACGATTTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGG

>B12HJ

ATGTGCAAGGCCGGTTTTGCCGGTTTTTAAACTCTCCGTGCCGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCC
TCATATCCGCTGTGCTGGATATCCTTCCCTCCTGACTTGATGGGTTCTTCCCACTCTTCATAGCAAT
TGCCACCCATTGCGTCTTTGCGCTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGCGGTGAATTACCCGTCGTGT
TAGCACCGGTTTGAATAGTCGACTAAGTTGGGGTACAGCGTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCAGAA
TGGGTAAAGCTCCCCTTTTGTTTTCCCCAGGTTGGCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTTATCTAGA
GCCGCACCGCAGGATCATGATTGGTATAAACCGGAAGGACTCGTAA

>B13HJ

GGCGGTTTTGCCGGTGACGACATACTATGATGTGCTGCTGCGTAGTCACCCCTCCTTGTCCACT
GTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTTCATGGCAATTGCCACCCAT
TGCGTCTTCCGCGCGGGCTGCTAGCTTATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAGT
TCGAATAGTGAACCTAATTGCGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCACCATGGGTAAAGC
TCCCCTTTGTTATCCCCTAATTGGCCTGCCAGGCTGGGTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCACA
GTATCATGATTGGTATGGGCCAGAGGGAACCTCGTAA

>B18HJ

GGTTTCGCCGGGGATGGTTCTATCTGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCACCCATAATGTTA
AACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCAGATTGTGCGCCAGG
GGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCGTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGGTTTTCTCTCCCT
GAATCATCATGCGCGACAAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGGGAGATAGCCTCCATT
GTCGGTCGCCCCGTCACCATGGGTAAATTTTTCCCCCTTTCTTTCATCCTGAAGCTGTTACGCTA
AGCTCGAATCATGGTCGCTGACGATTTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCA

>B20HJ

GGGGTTTTGCCGGTGAGGATGGTCCCTCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCACCCATAATG
TTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCAGATTGTGCGC

AGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCGTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGGTTTCTCTC
CCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGGGAGATAGCCTCCAT
TGTCGGTCGCCCCCGTACCATGGGTAAATTTTCCCCCTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTAG
CTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGG

>B21HJ

GGCGGTTTTCGCCGGGGATGGGGCTTGTATCGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCACCCATAATG
TTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCAGTGTGCAGATTGTCGCC
AGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCGTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGGTTTCTCTC
CCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGGGAGATAGCCTCCAT
TGTCGGTCGCCCCCGTACCATGGGTAAATTTTCCCCCTTCTCATCCTGAGCTGTTACGCTAG
CTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCA

>B23HJ

TTAATGTGCAAGCCGGTTTTCGCCGGTGAAAATGCTACTCGTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTC
ACCCATAATGTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCAGTGTGC
AGATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCGTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGC
GGTTTCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACGATGAAACGCTAACTTGTGAC
ATAGCCTCCATTGGCGGTGCCCCCGTACCATGAGTAAATTTTACCCTTCTCTCTCTCTGAGC
TGTTACGCTAGCTCAAATCTTGACCTCTGACGAATCCAACACAGAATCTTGATTGGTATGAACCCG
AAGTTCTCCAT

>B25HJ

TATGTGCAAGGCGGTTTTCGCCGATAGCGAGTCTCCCCGTGGTGGTGGCGTTCGGAACGTCAACCTCCAAC
TTGTCCACTGGGCTGGACGTTTACTCCGCTGGCTTGATGGACCTTCTCCGCTCTGTTCTGGCAATT
GCCACCATTTGCGACTTTCGCGCCCCGTTGCTATTTTATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTC
ATCACCTCTTCGAAAAGTGAACCTAATTGCGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCGCCCGTACCAT
GGGTAAAGCTCCCCTTTGTCTCTCCTAATTGGTCTGCTAGGCTGGTAGATCATTTTTTGTCTAGTG
CCGCCACACTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAAATGATTGGTATGGGCCAAAGAA
ATCTTAAAA

>B27HJ

TTATGTGCAATTGGGGTTTTCGCCGGTGACGTGGCTTACCGCTGACGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTC
TCCTTGCTCCACTGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCGCTCTTTCATGGCA
ATTGCCACCCATTGCGTCTTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCAT
GTCAGCACCAGTTCGAATAGTGAACCTAATTGCGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCGCCCGTCCAC
CATGGGTAAAGCTCCCCTTTGTCTCTCCCTAATTGGCCTGCCAGGCTGGGTGATCAGTTTTTGTCTA
ATGCCGCCNGACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGAACCTCGTAA

>B34HJ

GGTTTCGCCGGTGACTGGGCTATGATCGATGTCTTCCGTAAGTCATTCCCCCTCCCCACCAGTT
TACCGGACTACCCCTCCCGACCTCGTGATGGCCACCCCTCTGCAAGGCATGCTTTCATAGCTCC
CTTGCAATTGAGTTGGCATTATTGCGGGGAGGAGAGCGGGCGGTGAATCGCCTCCCCTTCTGCCA
TCATTCTAGGATACTAACCATGCTTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCGCCCGTACCATGGGTAAA
GCTTCCCCTTTTCAATCCGAAATGGGCTTCCATGAATCTAATGAATTCGCAGTATCATGATTGGTA
TGGGCCAGGGAACCTCGTAAATCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCGTAA

>B39HJ

GGCGGTTTTCGCCGGTGACCGATGCTATCCGTGCCCTTCGTCCGTAAGTCAACCCCTCCTTGTCCAC
TGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACCCA
TTGCGTCTTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCAG
TTCGAATAGTGAACCTAATTGCGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCGCCCGTACCATGGGTAAAG
CTCCCCTTTTGTCTCTCCCTAATTGGCCTGCCAGGCTGGGTGATCAGTTTTTGTCTAATGCCGCCAC
AGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGAACCTCGTAA

>B43HJ

GGGCGGTTTTCGCCGGGGATGATGCTCCCATGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCACCCATAAT
GTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCATATCATCCCTTGATGTCAGTGTGCAGATTGTCGC
CAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCGTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGGTTTCTCTC

CCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCGAGATAGCCTCCA
TTGTCGGTCGCCCCGTCACCATGGGTAAATTTTCCCCCTTTCCTCATCCTGAGCTGTTACGCTA
GCTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGGAAACTCGT
AA

>B49HJ

GCAAGGCCGGTTTTCGCCGGTGACGATGCTCTCCGTGCCGTCTACCGTAATCCAACCCCTCCTCAT
ATCCGCTGTGCTGGATATCCTTCCCTCCTGGCTTGATGGGTTCTTCCCACTCTTCATAGCAATTGCC
ACCCATTGCGTCTTGCGCTGGGTTGCTAGCTTATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGTCGTGTTAGC
ACGGGCTCGAATAGTTCGAGTAAGTTGGGGTACAGCCTCCATTGTCGGTCCGCCCCGTCAGCATGGG
TAAAGCTCCCCCTTGTTCCTCCCCAGGTTGGCCTGTTAGGCTGGGTGATCGGTTTTATCTAATGCCG
CGCGCAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCTAAA

>B4HJ

TATGTGCAAAGCGGTTTTCGCCGGTGATGGTGCTCCCCGTGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCTCAC
CCCATAATGTTAAACATCCGAGTGAACCCCTCTGCCCCATATCATCCCTTGATGTCACTGTGCAG
ATTGTCGCCAGGGGAATGTGTCAACCGTTGCCCTTGCCTCCGGTTGGATAATCCAATACCTGGCGG
TTTCCCTCTCCCTGAATCATCATGCGCGACAGCTTAATCTGGACAATGAAACGCTAACTTGCGAGAT
AGCCTCCATTGTCGGTCGCCCCGTCACCATGGGTAAATTTTCCCCCTTTCCTCATCCTGAGCTG
TTACGCTAGCTCGAATCATGGTCGCTGACGATTCCAACACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGGG
G

>B52HJ

TAATGTGCAAAGCGGTTTTCGCCGGTGAGGGTGCTGCCCATGCTGTCTTCCGTAAGTCAACCCCT
CCTTGTCCACTGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCCGCTCTTTTCATGGCA
ATTGCCACCCATTGCGTCTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGGCGGTGAATTACCCGCCAT
GTCAGCACCAGTTCGAATAGTGAACCTAACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTCGTCCCCGTCAC
CATGGGTAAAGCTCCCCTTGTCTCTCCTAATTGGCCTGCTAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTA
ATGCCGCCACAGTATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGGACTCGTAA

Cuadro 7. Comparación de las secuencias utilizando el algoritmo BLAST

	Identificación fenotípica	Identidad molecular	% Similitud	Valor de expectación	% Identidad
385BHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	89	00	100
B18HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	91	6e-175	99
B11HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	91	00	99
B23HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	89	8e-159	95
411AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	89	00	98
B43HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	92	0.0	99
392AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	84	5e-180	100
B21HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	90	00	100
100AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	89	1e-180	100
435AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	85	00	100
270BHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	86	2e-174	99
B4HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	91	0.0	99
262AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	94	00	99
394AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	92	00	99
B20HJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	94	0.0	99
373CHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	90	00	98
312BHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	89	3e-177	98
314AHJ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	87	00	100
387AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	4e-171	96
412AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	4e-111	87
395AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	9e-118	88
50CHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	91	9e-118	90
264AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	92	1e-106	89
140AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	2e-113	87
B25HJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	91	2e-80	82
250AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	1e-115	88
B49HJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	1e-166	96
87BHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	8e-168	96
B27HJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	96	2e-120	89
B13HJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	1e-112	88
146AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	84	2e-109	90
88CHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	93	3e-167	99
373AHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	7e-124	89
B34HJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	16	6e-15	92
B39HJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	95	3e-123	90
B52HJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	4e-127	89
55DHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	36	6e-15	92
B12HJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	94	4e-152	94
360BHJ	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	3e-177	97
316AHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	89	5e-160	99
312AHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	2e-169	97
55CHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	3e-167	97
323CHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	6e-169	97
57BHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	88	4e-156	95
370BHJ	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	2e-158	96
369BHJ	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	98	2e-164	97
233ACV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	86	1e-175	99
A36CV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	92	00	99
A35CV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	87	00	100
A10CV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	87	00	100
235ACV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	90	5e-180	99
257CCV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	94	00	99
176ACV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	89	0.0	100
9ACV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	90	0.0	99
222ACV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	87	2e-179	99
A28CV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	90	00	99
202BCV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	94	5e-110	89
281CCV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	95	2e-123	90
284BCV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	1e-126	89
217ACV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	1e-120	89
243ACV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	1e-121	89
103BCV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	92	1e-116	88
220ACV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	2e-123	89
314BCV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	6e-169	96
A13CV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	96	2e-123	89
166ACV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	93	5e-110	87

381DCV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	91	5e-115	90
A26CV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	96	7e-114	88
219ACV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	5e-125	89
31ECV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	96	1e-166	96
A25CV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	1e-171	97
307ACV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	97	2e-168	96
2ACV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	89	2e-108	89
88CCV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	2e-119	89
A39CV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	1e-176	98
335BCV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98	6e-159	94
87ACV	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	1e-170	99
24CCV	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	6e-179	98
27DCV	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	4e-166	97
24DCV	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	1e-161	96
A38CV	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	87	4e-151	99
23BCV	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	4e-156	96
A17CV	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	2e-163	96
A40CV	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	98	5e-165	97
A15CV	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	2e-168	97
237CCV	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	92	2e-149	99
343BCV	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Aspergillus calidoustus</i>	83	2e-164	99
237BCV	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	89	7e-104	89
283ACV	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Aspergillus calidoustus</i>	95	3e-172	98

Los aislados marcados con rojo indican que no hubo correlación entre la caracterización fenotípica y molecular.

Alineamiento de secuencias: Con el programa Gene Doc, se determinó la suma de pares y mínima entropía, para cada uno de los cinco alineamientos (Cuadro 6) y se eligió el mejor alineamiento, considerando la suma del valor más alto de, % de suma de pares y % de mínima entropía.

Cuadro 8. Suma de pares y mínima entropía.			
	% suma de pares	% mínima entropía	resultado
MUSCLE	8.864240699	2.26324258	11.1274833
MAFFT	8.602052148	3.07102941	11.6730816
T-COFFE	9.492966762	0	9.492966762
MULALIN	9.060695909	6.19992554	15.2606214
CLUSTALW	10	1.3070968	11.3070968

Elección del mejor modelo evolutivo. Con el programa jmodel test, se eligió el mejor modelo evolutivo de acuerdo a los valores más pequeños de los cuatro criterios de elección. El programa dio como resultado los dos mejores modelos que fueron; 1) el modelo GTR+I+G [verosimilitud (-lnL) 9,424.263, criterio de información de AKAIKE (AIC) 19300.5263, criterio de información bayesiano (BIC) 20,233.6916 y teoría de decisiones (DT) 7.0204]; 2) el modelo HKY+I+G [verosimilitud (-lnL) 9,431.104, criterio de información de AKAIKE (AIC) 19306.208, criterio de información bayesiano (BIC) 20,222.8571 y teoría de decisiones (DT) 1.0E-4].

Máxima verosimilitud. Se utilizó el modelo evolutivo de GTR+I+G. Este árbol formó 5 grupos; el grupo I que incluyó 28 aislados identificados como *A. niger* (Sección *Nigr*) y una secuencia de referencia de *A. niger* (número de acceso AY704271.1); el grupo II, incluyó 16 aislados identificados como *A. flavus* (Sección *Flavi*), excepto los aislados 55DHJ y B34HJ que fueron identificados como *A. niger* y que se agruparon en éste; el grupo III conformado por 6 secuencias de referencia (*A. calidoustus* número de acceso FN908395.1, *A. pseudodeflectus* número de acceso EF591709.1, *A. insuetus* número de acceso EU076351.1, *A. granulatus* número de acceso EF591713.1, *A. puniceus* número de acceso EF591710.1 y *A. ustus* con número de acceso EF591712.1) y los aislados 283ACV y 343BCV, correspondientes a la Sección *Usti*; el grupo IV incluyó 28 aislados de *A. fumigatus* y 7 secuencias de referencia (*A. fumisynnematus* número de acceso AB894615.1, *A. unilateralis* número de acceso HE974402.1, *A. fumigatus* número de acceso DQ534108.1, *A. lentulus* número de

acceso AB894620.1, *A. brevipes* número de acceso DQ094848.1, *A. novofumigatus* número de acceso DQ094868.1 y *A. fumigatiaffinis* con número de acceso DQ094865.1), todos correspondientes a la Sección *Fumigati*; y el grupo V que incluyó dos secuencias de referencia (*A. oryzae* con número de acceso NW_001884660.1 y *A. terreus* con número de acceso NT-165933.1). Se utilizó como grupo externo la secuencia correspondiente a *T. reesei*, con número de acceso NW_006711174.1.

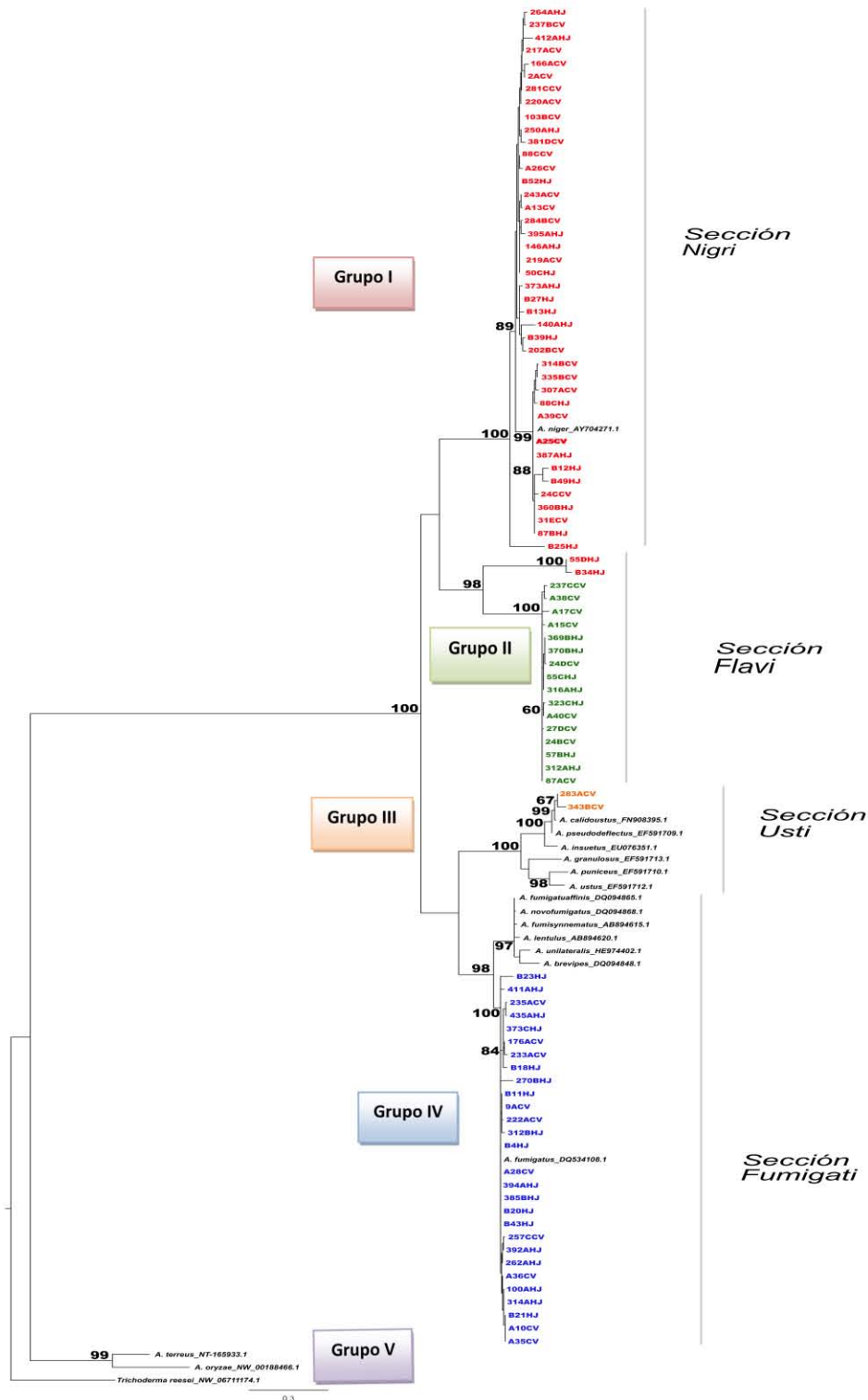


Figura 19. Árbol filogenético construido por el método de máxima verosimilitud. Se utilizó el programa MEGA6. Se muestran los bootstrap mayores al 60%.

Máxima parsimonia. Con este método se obtuvieron 5400 árboles, y se eligió el árbol de consenso, el cual mostró un índice de consistencia de 0.440 y un índice de retención de 0.880. Con este método, se obtuvieron 5 grupos; el grupo I que incluyó 28 aislados identificados como *A. niger* (Sección *Nigri*) y una secuencia de referencia de *A. niger* con número de acceso AY704271.1; el grupo II incluyó 16 aislados identificados como *A. flavus* (Sección *Flavi*), excepto los aislados 55DHJ y B34HJ que fueron identificados como *A. niger* y que se agruparon en éste; el grupo III incluyó 6 secuencias de referencia (*A. calidoustus* número de acceso FN908395.1, *A. pseudodeflectus* número de acceso EF591709.1, *A. insuetus* número de acceso EU076351.1, *A. granulatus* número de acceso EF591713.1, *A. puniceus* número de acceso EF591710.1 y *A. ustus* con número de acceso EF591712.1) y el aislado 283ACV y 343BCV correspondientes a la Sección *Usti*; y el grupo IV incluyó 28 aislados de *A. fumigatus* y 7 secuencias de referencia (*A. fumisynnematus* número de acceso AB894615.1, *A. unilateralis* número de acceso HE974402.1, *A. fumigatus* número de acceso DQ534108.1, *A. lentulus* número de acceso AB894620.1, *A. brevipes* número de acceso DQ094848.1, *A. novofumigatus* número de acceso DQ094868.1 y *A. fumigatiaffinis* número de acceso DQ094865.1), todos correspondientes a la Sección *Fumigati*; y el grupo V que incluyó dos secuencias de referencia (*A. oryzae* número de acceso NW_001884660.1 y *A. terreus* con número de acceso NT-165933.1) y el grupo externo correspondiente a *T. reesei* número de acceso NW_006711174.1.

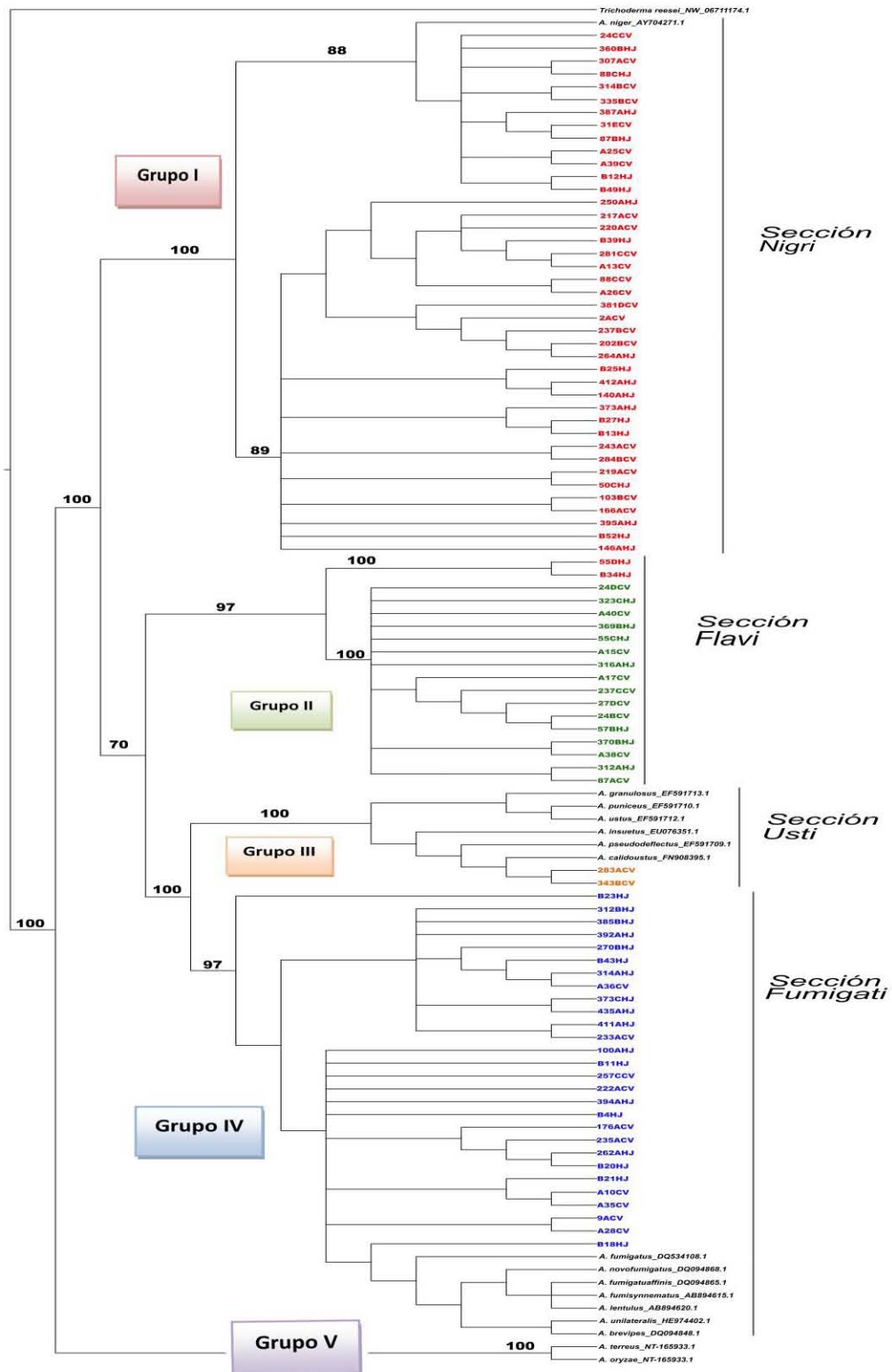


Figura 20. Árbol filogenético construido por el método de máxima parsimonia. Se utilizó el programa TNT.

Inferencia bayesiana. Este árbol permitió agrupar a los aislados en 5 grupos; el grupo I que incluyó 28 aislados identificados como *A. niger* (Sección *Nigri*) y una secuencia de referencia *A. niger* con número de acceso AY704271.1; el grupo II incluyó 16 aislados identificados como *A. flavus* (Sección *Flavi*), excepto los aislados 55DHJ y B34HJ, que fueron identificados como *A. niger* y que se agruparon en éste; el grupo III incluyó 6 secuencias de referencia (*A. calidoustus* número de acceso FN908395.1, *A. pseudodeflectus* número de acceso EF591709.1, *A. insuetus* número de acceso EU076351.1, *A. granulatus* número de acceso EF591713.1, *A. puniceus* número de acceso EF591710.1, *A. ustus* con número de acceso EF591712.1) y los aislados 283ACV y 343BCV correspondientes a *A. calidoustus* (Sección *Usti*); y el grupo IV incluyó 28 aislados de *A. fumigatus* y 7 secuencias de referencia (*A. fumisynnematus* número de acceso AB894615.1, *A. unilateralis* número de acceso HE974402.1, *A. fumigatus* número de acceso DQ534108.1, *A. lentulus* número de acceso AB894620.1, *A. brevipes* número de acceso DQ094848.1, *A. novofumigatus* número de acceso DQ094868.1 y *A. fumigatiaffinis* número de acceso DQ094865.1), todos correspondientes a la Sección *Fumigati*; y el grupo V que incluyó dos secuencias de referencia (*A. oryzae* número de acceso NW_001884660.1 y *A. terreus* con número de acceso NT-165933.1), y el grupo externo correspondiente a *T. reesei* (número de acceso NW_006711174.1).

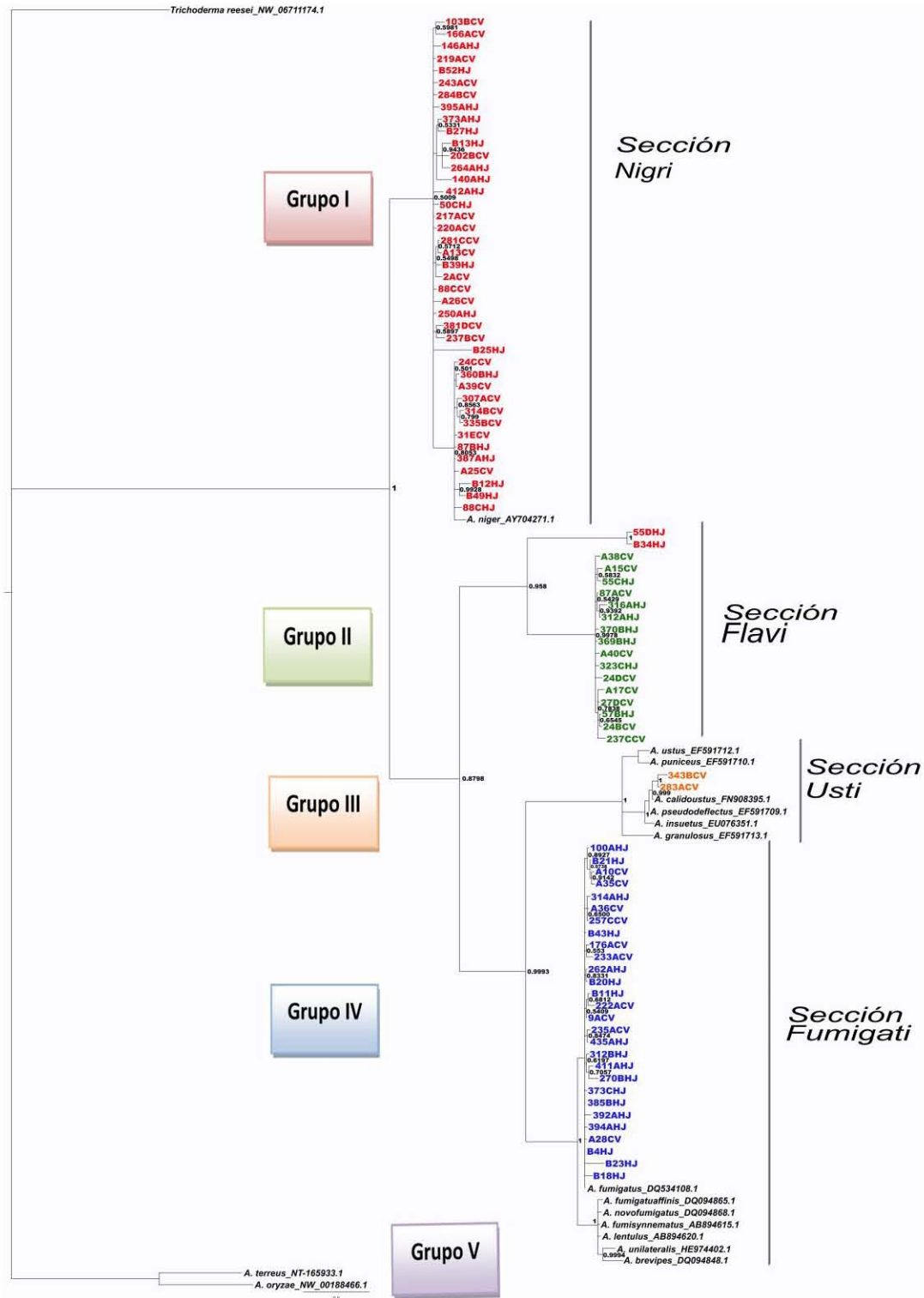


Figura 21. Árbol filogenético construido por el método de inferencia bayesiana. Se utilizó el programa MrBayes y se muestran los valores de verosimilitud.

DISCUSIÓN

Ha sido ampliamente demostrado que la AI en ambientes hospitalarios ha ido en aumento en los últimos años, fundamentalmente asociada a pacientes inmunocomprometidos^{14,15}, por lo que la identificación certera del agente causal es de gran importancia para realizar un diagnóstico temprano en el curso de la enfermedad, ya que en el laboratorio de rutina, algunas especies inusuales o con poca esporulación, son generalmente identificadas sólo a nivel de género, como *Aspergillus* spp., sin embargo, la identificación a nivel de especie, puede ser de gran importancia, ya que varios trabajos han demostrado una alta variabilidad genética en especies del género *Aspergillus*^{61,62,63,64,65,66,67,68}, lo que puede asociarse, en algunos casos, con la existencia de un ciclo sexual, que puede tener importantes implicaciones clínicas, dado que la recombinación podría dar lugar a descendientes que presenten una mayor virulencia o una mayor resistencia a los agentes antifúngicos^{37,69,70}, como ha sido evidenciado por Symoens³⁶ quien demostró que los patrones de sensibilidad antifúngica varían entre especies y por lo tanto, esto incide directamente en el tratamiento que debe administrarse al paciente. De manera que, la presencia de especies de *Aspergillus* potencialmente patógenas, en ambientes hospitalarios debe ser evidenciada para establecer medidas de prevención adecuadas.

Actualmente, en la mayoría de los laboratorios clínicos, el diagnóstico de rutina para la aspergilosis se realiza con base en métodos tradicionales como el cultivo y la identificación microscópica, lo cual necesita de un observador experimentado que no siempre acierta en la identificación, debido a que existen especies

morfológicamente muy parecidas, y el otro método es la detección de antígenos, particularmente galactomananas, sin embargo también tiene ciertos inconvenientes, ya que se ha demostrado reacción cruzada con otros hongos como *Geotrichum capitatum*, *Fusarium* y *Penicillium*^{71,72,73}.

Por esta razón, los métodos moleculares para la identificación de especies del género *Aspergillus* son una herramienta cada vez más utilizada en el diagnóstico de la aspergilosis, además ha permitido el descubrimiento de nuevas especies, morfológicamente similares dentro del género *Aspergillus*.

Actualmente, para una correcta identificación de las especies dentro del género *Aspergillus*, se sugiere la utilización de secuencias parciales de genes, entre los que se encuentran el de actina, calmodulina y β -tubulina, entre otros^{33,66,74,75,76,77}.

Por lo que en el presente trabajo utilizamos la secuencia parcial del gene de actina, uno de los genes sugeridos por Hong³³ y Araujo⁷⁵ para realizar la identificación molecular de los aislados de *Aspergillus* spp. colectados en ambientes de dos hospitales de la ciudad de México.

La identificación molecular de los aislados incluidos en el presente estudio, a través de la secuencia parcial del gene de actina, fue de gran utilidad, ya que nos permitió corroborar la identidad a nivel de especie de 69 de estos aislados, en los que hubo una correlación del 100% entre la identificación fenotípica y genotípica. Mientras que, 15 aislados identificados fenotípicamente como *A. flavus*, fueron identificados genotípicamente como *A. oryzae*, sin embargo ambas especies pertenecen a la Sección *Flavi*, este hallazgo concuerda con lo referido por

Samson⁷⁷, quien propone que *A. oryzae* representa un ecotipo distinto de *A. flavus* y no una especie distinta, de acuerdo a un análisis genómico comparativo entre estas especies. Por otro lado, cuatro aislados identificados fenotípicamente sólo como *Aspergillus* spp., a nivel molecular fueron ubicados como *A. calidoustus*; *A. niger* y *A. flavus*. Mientras que el aislado 237CCV, identificado fenotípicamente como *A. terreus*, a nivel molecular estuvo asociado con *A. oryzae*.

Dos aislados, 55DHJ y B34HJ, identificados feno y genotípicamente como *A. niger*, en el árbol no se agruparon con la Sección *Nigri*, quizá debido a los bajos valores de cobertura (query cover) que se obtuvieron al realizar el análisis con el algoritmo Blast.

Por otro lado, el análisis filogenético de los aislados estudiados utilizando el método de máxima parsimonia, inferencia bayesiana y máxima verosimilitud, mostró gran concordancia entre los tres métodos, en los cuales se observó la misma topología de grupos; grupo I, incluyendo aislados pertenecientes a la Sección *Nigri*; grupo II integrado por aislados pertenecientes a la Sección *Flavi*; grupo III, integrado por aislados de la Sección *Usti*; grupo IV conformado por aislados de la Sección *Fumigati*; y el grupo V que incluyó las secuencias de referencia. Por lo que, consideramos que la secuencia parcial del gene de actina, es un buen marcador como auxiliar en la identificación a nivel de especie para los aislados del género *Aspergillus*. Sin embargo, es pertinente aclarar que no deben eliminarse los métodos fenotípicos, ya que éstos pueden aportar información sobre la descripción de posibles nuevas especies.

En un trabajo realizado con estos mismos aislados, pero utilizando el gene de β -tubulina para la identificación de especies dentro del género *Aspergillus*, este marcador demostró una mayor habilidad para discriminar más especies diferentes entre las diferentes secciones^{78,79}, comparado con el gene de actina que no logró identificar tantas especies, probablemente porque en la actualidad aún es limitado el número de secuencias del gene de actina para las especies de todas las secciones del género *Aspergillus*, disponibles en el GenBank.

CONCLUSIONES

La comparación de las secuencias amplificadas con la secuencia parcial del gene de actina permitió una correlación del 100% a nivel de especie, entre la identificación genotípica y fenotípica, en 69 de los 89 aislados incluidos en el estudio, mientras que en 15 aislados sólo se relacionaron a nivel de Sección. Además, cuatro aislados identificados fenotípicamente como *Aspergillus* spp.; fueron ubicados en las especies *A. calidoustus*, *A. niger* y *A. flavus*.

El análisis filogenético de los aislados estudiados utilizando los métodos de máxima parsimonia, inferencia bayesiana y máxima verosimilitud, mostró gran concordancia entre éstos, en los cuales se observó la misma topología de grupos. Por lo tanto, la secuencia parcial del gene de actina, proporciona una herramienta de apoyo para la identificación de especies del género de *Aspergillus*, lo que puede ser de gran utilidad en el diagnóstico y tratamiento oportuno para pacientes con aspergilosis.

PROPUESTAS

Realizar una comparación entre diferentes marcadores moleculares, para determinar los que son más útiles en la identificación a nivel de especie, entre hongos del género *Aspergillus*, dada la importancia que significa para establecer un diagnóstico y tratamiento adecuado, fundamentalmente en pacientes inmunodeprimidos. Por lo que otros marcadores, como las secuencias parciales de los genes de calmodulina y β -tubulina serán utilizados para realizar este estudio.

REFERENCIAS

1. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergilosis. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(2):310-50.
2. Escribano P, Peláez T, Recio S, Bouza E, Guianea J. Characterization of clinical strains of *Aspergillus terreus* complex: molecular identification and antifungal susceptibility to azoles and amphotericin B. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(2):24-6.
3. Zhao J, Kong F, Li R, Wang X, Wan Z, Wang D. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol. 2001; 39(6): 2261-6.
4. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. J Clin Microbiol. 2000; 38(4):1510-15.
5. Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, Azie N, Quan SP, Meier-Kriesche HU, et al. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. J Infect. 2012; 65(5):453-64.
6. Barton RC. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. Scientifica (Cairo). 2013; 2013:1-29.
7. Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia. 1999; 91(5):553-56.
8. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. 5 ed. Mc Graw Hill education. China. 2014. p. 290-301.
9. Palacio A, Cuétara MS, Pontón J. el diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. Rev iberoam micol. 2003. 20:90-98.
10. Alcazar-Fouli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequences-based identification. Antimicrob. Agents Chemother. 2008. 52:1244-51.
11. Abarca M. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev iberoam Micol. 2000. 17:S79-S84.
12. Fortún J, Mejía Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y

- tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012. 30(4): 201-208.
13. Kac G, Roux P, Poirot L, Miyokes M, Lancastre F. *Aspegillus* et *Aspegilloses*: 'Etude rétrospective dans deux hopitaux Parisiens. 1995. *J. Mycol Med.* 5:75-85.
 14. Bodey GP, Vartivarian S. *Aspergillois*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1989; 8(5):413–37.
 15. Denning DW. Invasive aspergillois in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 1994; 7:456–462.
 16. Lass-Flörl C, Griff K, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, Freund M, *et al.* Epidemiology and outcome of infection due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *Br J Haematol.* 2005; 131(2): 201-7.
 17. Mokaddas E, Burhamah MHA, Ahmad S, Khan ZU. Invasive pulmonary aspergillois due to *Aspergillus terreus*: value of DNA, galactomannan and (1-3)- β -D-glucan detection in serum samples as an adjunct to diagnosis. *J Med Microbiol.* 2010; 59:1519–23.
 18. Aisner J, Schimpff SC, Bennett JE, Young VM, Wiernik PH. *Aspergillus* infections in cancer patients: association with fireproofing materials in a new hospital. *JAMA.* 1976; 235(4):411–2.
 19. Arnow PM, Andersen RL, Mainous PD, Smith EJ. Pulmonary aspergillois during hospital renovation. *Am Rev Respir Dis.* 1978; 118(1):49–53.
 20. Barnes RA, Rogers TR. Control of an outbreak of nosocomial aspergillois by laminar air-flow isolation. *J Hosp Infect.* 1989; 14(2):89–94.
 21. Sherertz RJ, Belani A, Kramer BS, Elfenbein GJ, Weiner RS, Sullivan ML, Thomas RG, Samsa GP. Impact of air filtration on nosocomial *Aspergillus* infection. Unique risk of bone marrow transplant recipients. *Am J Med.* 1987; 83(4):709–18.
 22. Walsh TJ, Dixon DM. Nosocomial aspergillois: environmental microbiology, hospital epidemiology, diagnosis and treatment. *Eur J Epidemiol.* 1989; 5(2):131–42.
 23. Patterson JE, Zidouh A, Minitier P, Andriole VT, Patterson TF. Hospital epidemiologic surveillance for invasive aspergillois: patient demographics

- and the utility of antigen detection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997; 18(2):104–8.
24. Iwen P, Reed EC, Armitage JO, Bierman PJ, Kessinger A, Vose JM, *et al.* Nosocomial invasive aspergillosis in lymphoma patients treated with bone marrow or peripheral stem cell transplants. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993; 14(3):131–9.
25. Iwen PC, Davis JC, Reed EC, Winfield BA, Hinrichs SH. Airborne fungal spore monitoring in a protective environment during hospital construction, and correlation with an outbreak of invasive aspergillosis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994; 15(5):303–6.
26. Rogers TR. Epidemiology and control of nosocomial fungal infections. *Curr Opin Infect Dis.* 1995; 8(4):287–90.
27. Klich MA, Pitt JI. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, CSIRO Division of Food Processing, 1988.
28. Martínez-Herrera EO, Duarte-Escalante E, Frías De León MG, Calderón-Ezquerro MC, Jiménez-Martínez MC, Arenas-Guzmán R, *et al.* Caracterización fenotípica de aislados de *Aspergillus* spp. obtenidos en ambientes intrahospitalarios. X Congreso Bienal de Dermatología. Academia Mexicana de Dermatología. Guanajuato, Guanajuato, México. 13-16 de noviembre de 2013.
29. Martínez-Herrera EO, Duarte-Escalante E, Frías De León MG, Calderón-Ezquerro MC, Jiménez-Martínez MC, Acosta-Altamirano G, *et al.* "Diversidad fúngica en ambientes intrahospitalarios de dos institutos de salud del distrito federal" primer congreso de alumnos del doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, 25-26 de septiembre 2014.
30. Raper BK, Fennell DI. The genus *Aspergillus*, the Williams and Wilkins, Baltimore, Md. 1965.
31. Gams W, Christensen M, Onions AHS, Pitt JI, Samson RA. "Infrageneric taxa of *Aspergillus*," in *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*, R. A. Samson and J. I. Pitt, Eds. *Advances in Penicillium and Aspergillus*

- systematics. Plenum Press, 1985: 55-64.
32. Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in mycology*. 2007. 59:147-203.
33. Hong SB, Shing HD, Hong J, Frisvad JC, Nielsen PV, Varga J, *et al.* New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2008; 93(1-2): 87-98.
34. Krimitzas A, Pyrri I, Kouvelis VN, Kapsanaki-Gotsi E, Tipas MA. A phylogenetic analysis of greek isolates of *Aspergillus* species based on morphology and nuclear and mitochondrial gene sequences. *BioMed*. 2013. 1-18.
35. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, hong S-B, Klassen CHW, Perrone G, *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *aspergillus*. *Stud Mycol*. 2014; 78:141-173.
36. Symoens F, Haase G, Pihet M, Carrera J, Beglin H, Degand N, Mely L, Bouchara JP. Unusual *Aspergillus* Species in patients with cystic fibrosis. *Med Mycol*. 2010. 48 (suppl. I):S10-S16.
37. Geiser DM. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Med Mycol*. 2009; 47(1):S21-6.
38. Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol*. 2007; 59:1-10
39. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryotic Cell*. 2006; 5(10):1705-12.
40. Van PE, Daeseleire E, De Clercq N, Herman L, Verbeken A, Heyndrickx M, *et al.* Restriction analysis of an amplified rodA gene fragment to distinguish *Aspergillus fumigatus* var. *ellipticus* from *Aspergillus fumigatus* var. *fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2012; 333(2):153-9.
41. Tam EW, Chen JH, Lau EC, Ngan AH, Fung KS, Lee KC, *et al.* Misidentification of *Aspergillus nomius* and *Aspergillus tamarisii* as *Aspergillus*

- flavus*: characterization by internal transcribed spacer, β -tubulin, and calmodulin gene sequencing, metabolic fingerprinting, and matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(4):1153-60.
42. Perfect JR. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Curr Med Res Opin.* 2013; 29(4):3–11.
43. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus*-What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?. *PLOS Pathogens.* 2013. 9.
44. Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Frías-De-León MG, Canteros C, Castañón-Olivares LR, Reyes-Montes MR. AFLP analysis reveals high genetic diversity but low population structure in *Coccidioides posadasii* isolates from Mexico and Argentina. *BMC Infect Dis.* 2013; 13:411
45. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25(17):3389-3402.
46. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.* 2000. 302:205-217.
47. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994. 22:4 673-4 680.
48. Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Method Enzymol.* 1996. 266: 383-402.
49. Higgins DG, Sharp PM. CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene.* 1988. 73:237-244.
50. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004. 32:1792-1797.
51. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 2004, 5:113.
52. Corpet FM. *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.* *Nucl Acids Res.* 1988. 16 (22):10881-10890.

53. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002. 30:3059-3066.
54. Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* 2005. 33:511-518.
55. Posada D, Crandall KA. ModelTest: testing the best-fit model of nucleotide substitution. *Bioinformatics.* 1998. 14: 817-818.
56. Posada D, Buckley TR. Model selection and model averaging in phylogenetic: Advantages of Akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio. *Syst Biol.* 2004. 53: 793-808.
57. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013. 30: 2725-2729.
58. Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics.* 2008. 24: 774-786.
59. Huelsenbeck JP, Ronquist FR. MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001. 17: 754-75.
60. Hillis DM, Bull JJ. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol.* 1993. 42(2):182-192.
61. Chang P-K, Ehrlich K. What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*? *Int. J. Food Microbiol.* 2010. 138:189-199.
62. Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, *et al.* molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J. Clin. Microbiol.* 1988. Vol. 36 no 6:1494-1500.
63. Debeaupuis J P. Sarfati J, Chazalet V, Latge JP. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 1997. 65:3080-3085.

64. Goncalves S S, Cano J F, Stchigel A M, Godoy-Martinez P C, Correa B, *et al.* molecular phylogeny and phenotypic variability of clinical and environmental strains of *Aspergillus flavus*. 2012 Fungal Biol. 116:1146-1155.
65. Refojo N, Duarte-Escalante E, Dignani M A, Hevia A I, Abrabtes R A, Davel G, *et al.* Rev Iberoam Micol. 2013. 30(1):25-30.
66. Serrano R, Gusmão L, Amorim A, Araujo R. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. BMC Microbiol. 2011. 11:82.
67. Solorzona C D, Abbas H K, Zablutowicz R M, Chang P K, Jones W A. Genetic variability of *Aspergillus flavus* isolates from a Mississippi corn field. The scientific world J. 2014.
68. Susca A, Perrone G, Cozzi G, Stea G, Logrieco A F, Mule G. multilocus sequence analysis of *Aspergillus sect. Nigri* in dried vine. Int. J. Food Microbiol. 2013. 165:163-168.
69. Dyer PS, Paoletti M. Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? Med Mycol. 2005. 43(suppl. 1):S7-14.
70. O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of asexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature. 2009. 457:471-474.
71. Giachino M, Chiapello N, Bezzio S, Fagioli F, Saracco P, Alfarano A, *et al.* *Aspergillus galactomanna* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay cross-reactivity caused by invasive *Geotrichum capitatum*. J Clin Microbiol. 2006. 44(9): 3432-3434.
72. Kappe R, Schulze-Berge A. New cause for false-positive results with the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test. J Clin Microbiol. 1993. 2489-2490.
73. Pía Roiz M, García MS, Martínez-Martínez L. Repetición del test Platelia™ *Aspergillus* en muestras positivas para la detección de galactomanano en suero ¿es necesario repetir el test?. Rev Iberoam Micol. 2014. En prensa.

74. Howard SJ, Harrison E, Bowyer P, Vargas J, Denning DW. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2011. 4802-4809.
75. Araujo R, Amorim A, Gusmão. Diversity and specificity of microsatellites within *Aspergillus* section *Fumigati*. *BMC microbiol.* 2012. 12: 154
76. Samson RA, Varga J, Witiak SM, Geiser D.M. The species concept in *Aspergillus*: recommendation of an international panel. *Stud Mycol.* 2007. 59: 71-73.
77. Samson RA, Varga J. What is a species in *Aspergillus*? *Med Mycol.* 2009. 47 (supplement I):S13-S20.
78. Muñoz-Calderón M, Álvarez-Ayala LS, Díaz-Lomelí PG, Martínez-Herrera E, Rosas-De-Paz E, Frías-De-León-MG, *et al.* Identificación fenotípica y genotípica de aislados de *Aspergillus* spp. obtenidos en áreas críticas de dos hospitales de México. VIII Congreso Latinoamericano de Micología. Medellín, Colombia. 4-7 de noviembre de 2014. (Ca 13.11).
79. Álvarez-Ayala LS. Tipificación molecular de aislados ambientales de *Aspergillus fumigatus* presentes en dos hospitales de la Ciudad de México. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México, 2015.