

Determinación de haplotipos de *Bactericera cockerelli* en la provincia de Huancabamba - Piura, Peru



Heidy Gamarra, Yanina Correa, Eva Huaman, Jan Kreuze

2022



CIP
INTERNATIONAL
POTATO CENTER



CGIAR

Determinación de haplotipos de *Bactericera cockerelli* en la provincia de Huancabamba - Piura, Peru

© International Potato Center 2022

CIP publications contribute important development information to the public arena. Readers are encouraged to quote or reproduce material from them in their own publications. As copyright holder CIP requests acknowledgement and a copy of the publication where the citation or material appears. Please send a copy to the Communications Department at the address below.

International Potato Center
P.O. Box 1558, Lima 12, Peru
cip@cgiar.org • www.cipotato.org

Citation:

Gamarra, H.; Correa, Y.; Huaman, E.; Kreuze, J. 2022. Determinación de haplotipos de *Bactericera cockerelli* en la provincia de Huancabamba - Piura, Perú. International Potato Center. 27 p.

Design and Layout:

Communications Department

2022

CIP also thanks all donors and organizations that globally support its work through their contributions to the CGIAR Trust Fund: www.cgiar.org/funders



This publication is copyrighted by the International Potato Center (CIP). It is licensed for use under the Creative Commons Attribution 4.0 International License

1. INTRODUCCIÓN

Bactericera cockerelli es un insecto polífago que afecta solanáceas de importancia económica como papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), berenjena (*Solanum melongena*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y otras solanáceas silvestres (CABI, 2022).

El daño causado puede ser de dos formas, la directa la producen principalmente las ninfas. Al succionar la savia para alimentarse segregan toxinas a la planta además de las excretas que dejan en las hojas pueden dar origen a la formación de hongos saprófitos. El daño indirecto es aún más alarmante pues *B. cockerelli* es el vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso) (sinónimo *Ca. Liberibacter psyllaourus*). Esta bacteria ocasiona la devastadora enfermedad llamada *zebra chip* o papa manchada (Pérez et al., 2021).

Con el objetivo de entender la dinámica poblacional temporal y espacial de *B. cockerelli* se está empleando un nivel de clasificación más específico mediante los haplotipos. Definiendo un haplotipo como la forma genética que difiere de cualquier otra forma por variaciones en su secuencia de ADN en al menos un nucleótido (Cerna et al., 2021). Estudios han identificado cuatro tipos de haplotipos mitocondriales dentro de Estados Unidos que están asociados a cuatro regiones geográficas: Oeste, Central, Noroeste, Suroeste (Swisher et al., 2014).

En Sudamérica, específicamente en Ecuador se dio el primer reporte de *B. cockerelli* afectando plantaciones de papa, y mediante el análisis de la secuencia COI se determinó que los especímenes correspondían al haplotipo central. El psílido de la papa está ampliamente distribuido en América del Norte (México, Estados Unidos y Canadá) y también en países de Centroamérica como Guatemala, Honduras y Nicaragua (Castillo et al., 2019).

2. OBJETIVO

Determinar el haplotipo mitocondrial de *B. cockerelli* mediante la secuenciación de la subunidad I del citocromo oxidasa mitocondrial (COI) de los individuos colectados en la provincia de Huancabamba (Piura).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales, equipos y reactivos

3.1.1 Materiales

- Tubos colectores.
- Aspirador de insectos
- Pinzas y estiletes entomológicos.
- Pinceles
- Bolsas de plástico
- Rotuladores
- Puntas para micropipetores
- Micropipetores
- Tubos de microcentrífuga 1.5 ml

- Tubos para PCR
- Vasos de precipitación
- Probetas
- Matraces
- Cajas conservadoras
- Cámaras para electroforesis horizontal
- Moldes de acrílico
- Espátulas

3.1.2 Reactivos

- CTAB 2%
- Cloroformo: Alcohól Isoamílico
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Agua libre de nucleasas
- SALB 10X
- Agarosa
- TBE10X
- Gel red
- Cebadores
- dNTPs
- MgCl₂
- Enzima Taq-Polimerasa

3.1.3 Equipos

- Fuente de poder
- Fotodocumentador
- Centrífuga
- Termociclador
- Baño María

3.2 Métodos

3.2.1 Extracción de ADN

Se probó dos protocolos de extracción de ADN para *B. cockerelli*: El protocolo RPEX y el protocolo CTAB.

Protocolo RPEX

Para la extracción de ADN del psílido de la papa se procedió de acuerdo con protocolo de extracción rápida (RPEX) de Crosslin et al. (2013) modificado por Castillo & Llumiyinga (2021); el cual se detalla a continuación.

Procedimiento:

1. En un microtubo agregar 75 ul del Buffer de lisis (100mM Tris-Hcl, 5mM EDTA, 0.5% Tween 20) y un individuo adulto de *Bactericera cockerelli*.
2. Con ayuda de un pistilo macerar el insecto.

3. Agregar 1 ul de Proteinasa K (20mg/ml).
4. Incubar en un termociclador a 37°C por 1 hora, 100°C por 10 minutos y finalmente se almacena a 10°C.
5. Centrifugar a 1600g por 10 segundos. Se puede utilizar directamente para la amplificación en PCR o se conserva a -20°C para su posterior uso.

Protocolo CTAB

La extracción de ADN de los *B. cockerelli* se hizo mediante el protocolo CTAB, modificado por el laboratorio de entomología *Aberdeen Research Extension* a partir de: Marzachi, C., Veratti, F., and Bosco, D., 1998. Direct PCR of phytoplasmas in experimentally infected insects. *Annals of Applied Biology* 133:45-54.

Procedimiento:

- Poner 1 o 2 insectos en un tubo de microcentrífuga y agregar 300 ul de CTAB 2% y macerar con ayuda de un *pestle*, luego agregar 200 ul de CTAB 2% (Volumen final es 500 ul), calentar en baño maría a 60°C por 30 minutos. Mezclar suavemente por inversión cada 10 minutos.
- Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos. Transferir el sobrenadante en un nuevo tubo.
- Agregar el mismo volumen (500 ul) de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), mezclar con el uso del vortex y centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
- Transferir el sobrenadante (fase superior) a un nuevo tubo y agregar 2/3 del volumen de isopropanol helado (mantener a -20°C), centrifugar por 20 minutos a 14000rpm. Tener cuidado con el pellet ya que está en el fondo del tubo, es pequeño y tiene un color claro.
- Lavar el pellet con 300 ul de etanol al 70% y centrifugar a 10000rpm por 5 minutos.
- Dejar secar el pellet y resuspender el ADN con 30 – 50 ul con agua libre de nucleasas (para un psílido se recomienda agregar solo 30 ul). Mantener a -20°C.

3.2.2 Identificación molecular de *B. cockerelli*

Una vez extraído el ADN de *B. cockerelli*, se amplificó mediante la técnica de la PCR la secuencia de la subunidad I del gen mitocondrial (COI) de *B. cockerelli*, una región de 500 bp. Se procedió según la metodología empleada por Crosslin et al. (2011), usando los siguientes cebadores: COIF3 (5'-TACGCCATACTAGCAATCGG-3') COIR3 (5'-GAGTAACGTCGTGGTATTCC-3').

Concentraciones de los reactivos de la PCR

La concentración de los reactivos del master mix se consideró de acuerdo a lo realizado por Castillo & Llumiquinga (2021) tal como se describe en la Tabla 1, llevándose a un volumen final de 20 µL.

Tabla 1

Concentraciones de reacción para la amplificación del gen de la subunidad I del citocromo oxidasa mitocondrial (COI) de *B. cockerelli*.

Reactivos	Concentración final
Agua	-

Buffer	1x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,1 mM
COIF3	0,5 uM
COIR3	0,5 uM
Taq Polimerasa	0,05 U/μL
ADN	-

Nota: Adaptado de Crosslin et al. (2011).

El volumen de ADN de la muestra que se agregó fue de 1 μl y la cantidad de agua se ajustó hasta alcanzar el volumen final de la reacción. El programa para el PCR que se siguió fue el siguiente: 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 52 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos, seguido de una incubación final a 72 °C por 5 minutos.

Los fragmentos de restricción resultantes se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1%. Los geles se corrieron 70 voltios durante 80 minutos y posteriormente se visualizaron con un trans iluminador UV a 254 nm. Las imágenes se registrarán con un sistema de documentación de geles (Griffith & Shaw, 1998).

3.2.3 Determinación de los haplotipos mitocondriales

Los fragmentos amplificados del gen COI (500bp) mediante PCR, se purificaron mediante un kit comercial para luego ser cuantificados por espectrofotometría y posteriormente ser enviados al servicio de secuenciación.

3.2.4 Purificación

La purificación se realizó mediante el kit de roche High Pure PCR Product Purification procediendo según el siguiente protocolo:

1. Una vez terminada la PCR, poner 100 ul del producto amplificado en un tubo de 1.5ml y añadir 500ul del Binding Buffer. Mezclar suavemente.
2. Insertar un High Pure Filter en un Collection tube. Luego transferir el contenido del paso anterior en la parte superior del Filer tube. Centrifugar a 14000 rpm por un minuto.
3. Desconectar el Filter tube y descartar la solución. Conectar el filter tube en el mismo Collection tube.
4. Agregar 500 ul del Wash Buffer en la parte superior del Filter tube. Centrifugar a 14000 rpm por un minuto.
5. Descartar la solución y reconectar el Filter Tube con el mismo Collection Tube. Agregar 200ul del Wash Buffer. Centrifugar a 14000 rpm por un minuto.
6. Descartar la solución y el Collection Tube. Reconectar el Filter tube en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
7. Agregar 50ul de agua libre de nucleasas en la parte superior del Filter Tube. Centrifugar a 14000 rpm por un minuto.

3.2.5 Secuenciamiento en MacroGen

Especificaciones para el envío de las muestras.

Ingresar al siguiente enlace:

https://dna.macrogen-singapore.com/eng/support/ces/guide/ces_sample_prep.jsp

- **Las muestras: Producto de PCR**

- ii) PCR fragments

- Preparation

- The DNA is free of contaminants, unused primers or dNTPs. PCR templates that do not undergo any kind of post PCR clean up are not suitable for sequencing and will yield unusable sequence data. It is highly recommended that your PCR template is first observed on a gel to confirm that there is a specific product with the correct size. Gel extraction kit or PCR cleanup kit can be used to remove all of the unwanted elements from your template.

- **2) Host strains**

- The host strain can have an impact on the quality of the template DNA prepared even using the best methods. DH5- α strains consistently produce good results. HB101, XL-1 Blue, JM109 and MV1190 are usually fine but JM101 is often poor. The growth media you use can also affect the outcome yields, while LB is usually fine.

- **3) Quantitation**

- Sequencers are able to handle a wide range of DNA concentrations however with very low amounts of DNA the data quality will be significantly affected.

- Using UV absorbance to quantitate dilute DNA solutions tends to give widely inaccurate results.

- A good way to quantitate DNA is to run an aliquot on a minigel and compare the intensity to the a control of a known concentration. There are also concentration ladders that are commercially available. For each reaction, please provide 10 ng/100 bases, and at least 20 ng/ μ l solution in deionized water. Please provide at least 10 μ l for any possible re-sequencing.

Según las especificaciones anteriores se procedió a hacer diluciones de los productos de PCR previamente purificadas con el Kit de Roche.

Diluciones

Diluciones a 50 ng/ μ l de 49 muestras de *Bactericera cockerelli*

Aplicando la fórmula de $C1V1=C2V2$

C1= Concentración inicial del pcr purificado de *Bactericera cockerelli*.

C2= La concentración deseada, en nuestro caso 50 ng/ μ l.

V1= El volumen que necesitamos extraer para llegar a la concentración deseada (50ng/ μ l)

V2= El volumen al que vamos a diluir la muestra es 30 μ l.

Los primers

4) Primers preparation

Primer Considerations

Primers should be provided in DI water at the required concentration (see table above).

- High Purity
- Appropriate concentration
- No secondary priming sites
- No mismatches
- A length of 18-25 bases.
- GC% content between 40% and 60%.
- A Tm (melting temperature) between 55°C and 60°C
- No significant hairpins (>3bp)
- Free of salts, EDTA, or other contaminants

Please supply primers at concentration of (10 pmole/ μ l =60 ng/ μ l) in deionized water at volume of greater than 20 μ l.

Primers supplied by customers should be desalted or purified. Crude primers generally do not work well for sequencing. We have the following primers available at no extra charge.

Go to Universal Primer List

Según las especificaciones de la página de Macrogen, la concentración de los primers es 10pmol/ μ l.

El stock que tenemos es de 100 pmol/ μ l, entonces se hizo una dilución con agua libre de nucleasas (NFW) para llegar a la concentración deseada.

3.2.6 Pedido del servicio de secuenciamiento en Macrogen

Primero, entrar al Macrogen y pedir una cotización, en la cual especificaremos el servicio que se requiere contratar y el número de muestras. Y luego generar la orden de servicio con las especificaciones de las muestras y primers.

Generar la cotización en el siguiente enlace:

<https://dna.macrogen.com/quotation/retrieveCesQuotation.do?menuCd=QUO100>

4. RESULTADOS

Después de emplear el ADN extraído con ambos protocolos en una PCR para amplificar el fragmento COI, se visualizó las bandas en un gel de agarosa. Por el cual se determinó que las muestras extraídas mediante el protocolo CTAB generan menos bandas inespecíficas. Nótese carril 11 y 12 de la Figura 1.

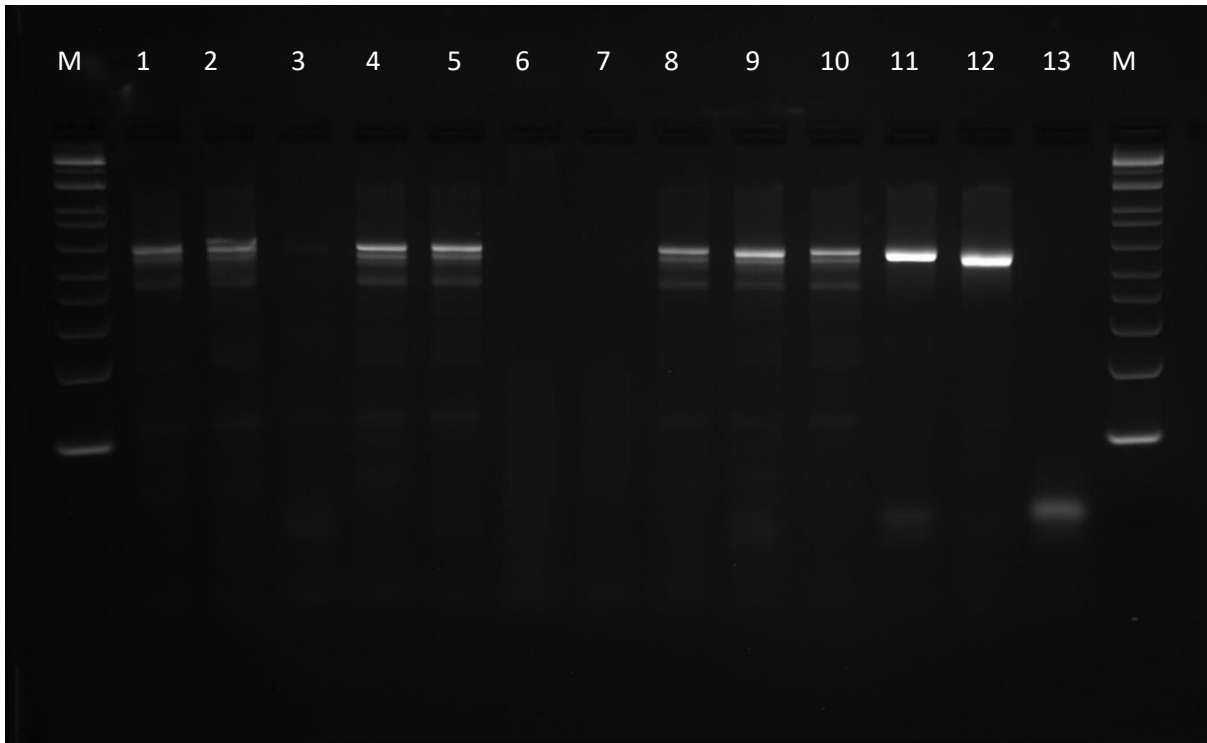


Figura 1. Gel de agarosa 2%, 100V/70 minutos. Se cargó solo 10 ul del producto de PCR + 5 ul SALB1X+GR

También se probó la cantidad de ADN de las muestras extraídas a utilizar determinándose que la cantidad optima de 1 ul (Figura 2).

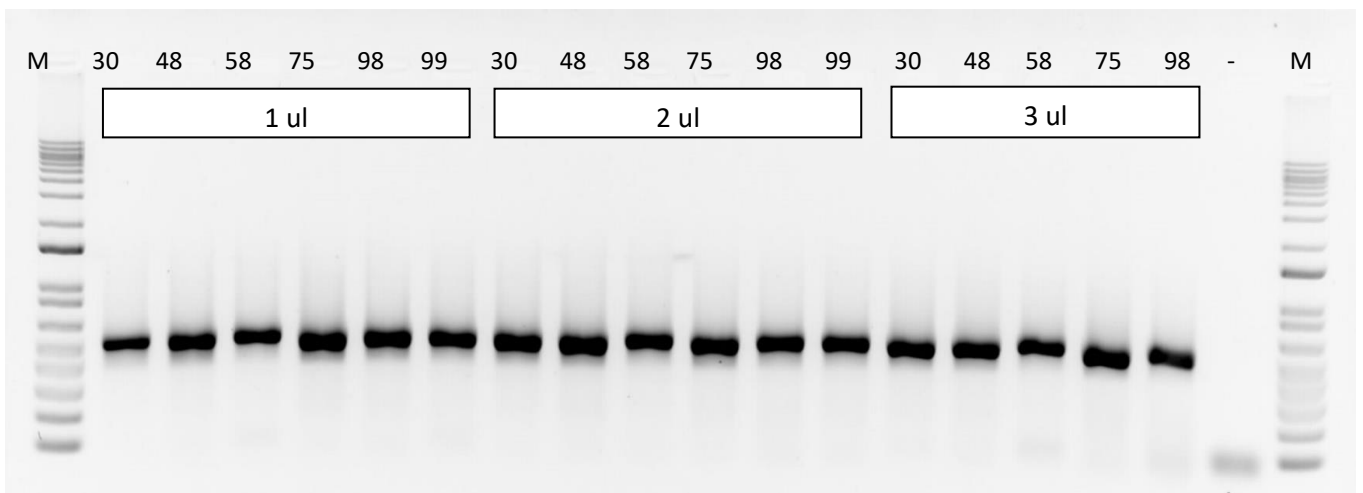


Figura 2. Prueba para determinar la cantidad de ADN a agregar al master mix.

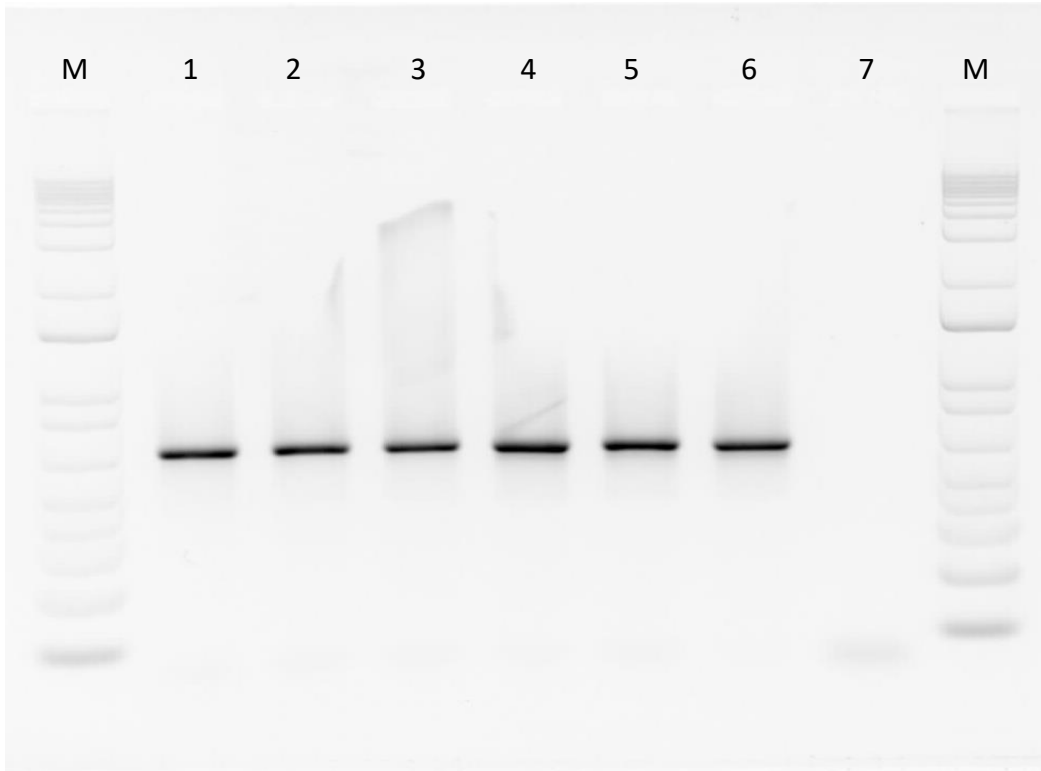


Figura 3. De izquierda a derecha: 1Kb plus, Sample30, Sample48, Sample58, Sample75, Sample98, Sample99, Control -, 1Kb plus

4.1 PCR de las muestras de *B. cockerelli*.

La región COI de las muestras de ADN de *Bactericera cockerelli* colectadas en Huancabamba se amplificaron en una PCR y sus productos se observaron en un gel de agarosa. Solo se corrió 5 ul del producto de PCR.

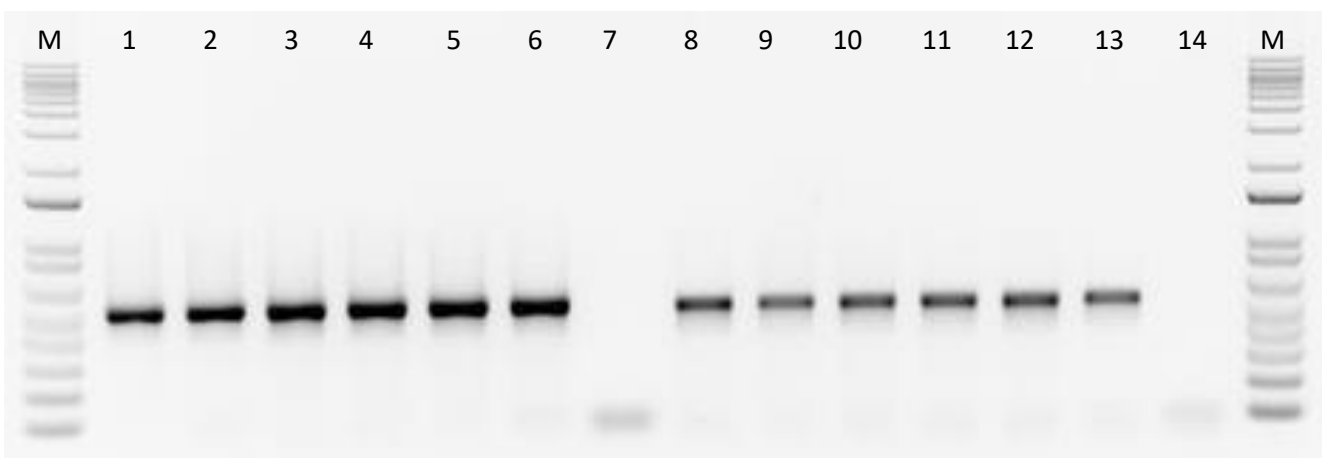


Figura 4. De izquierda a derecha: 1Kb plus, C4P3, C5P4, C10P2, C11P1, C12P2, C14P1, Control -, C17P1, C18P1, C21P1, C22P2, C24P1, C25P1, Control -, 1Kb plus

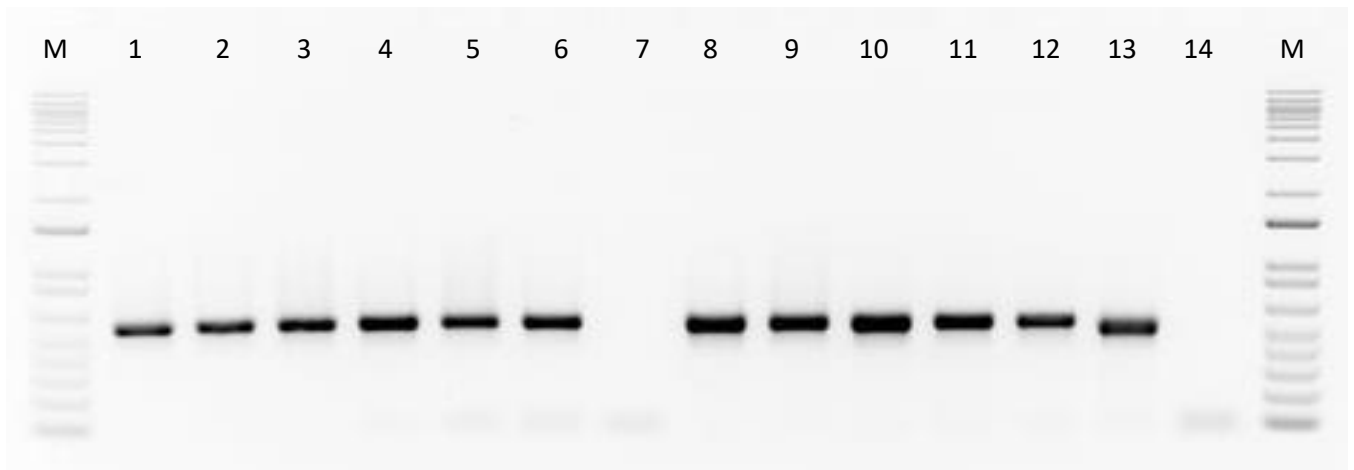


Figura 5. De izquierda a derecha: 1Kb plus, C17P1, C18P1, C21P1, C22P2, C24P1, C25P1, Control -, C26P1, C27P1, C28P1, C32P1, C37P1, C38P2, Control -, 1Kb plus

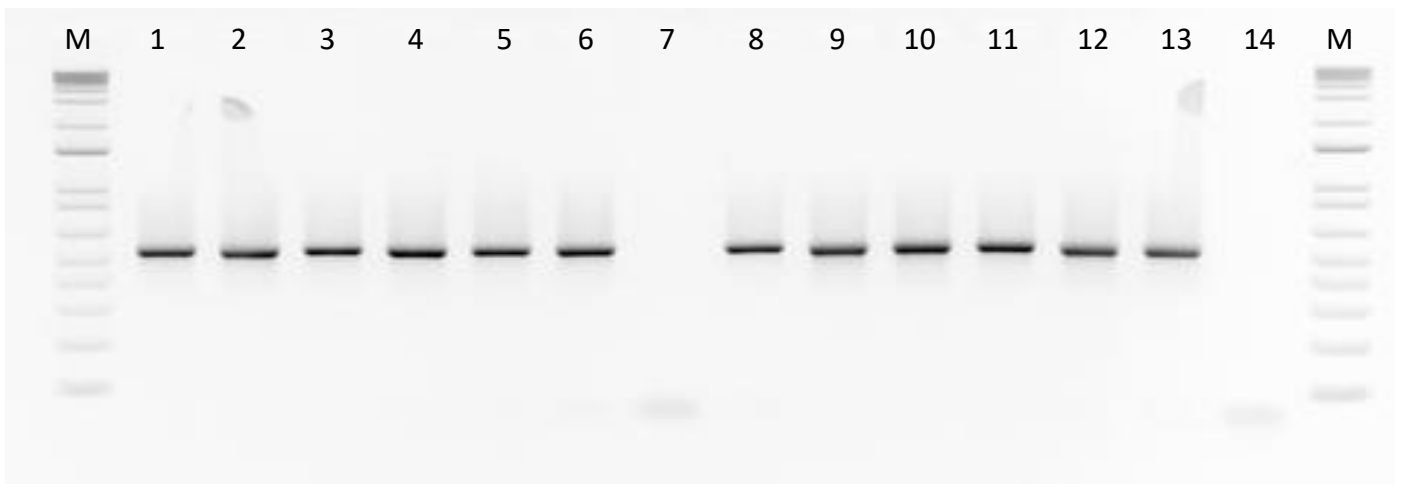


Figura 6. De izquierda a derecha: 1Kb plus, C40P1, C41P1, C42P1, C44P1, C45P1, C47P1, Control -, Control +, C30P1, C33P1, C39P1, C20P1, C29P1, Control -, 1Kb plus

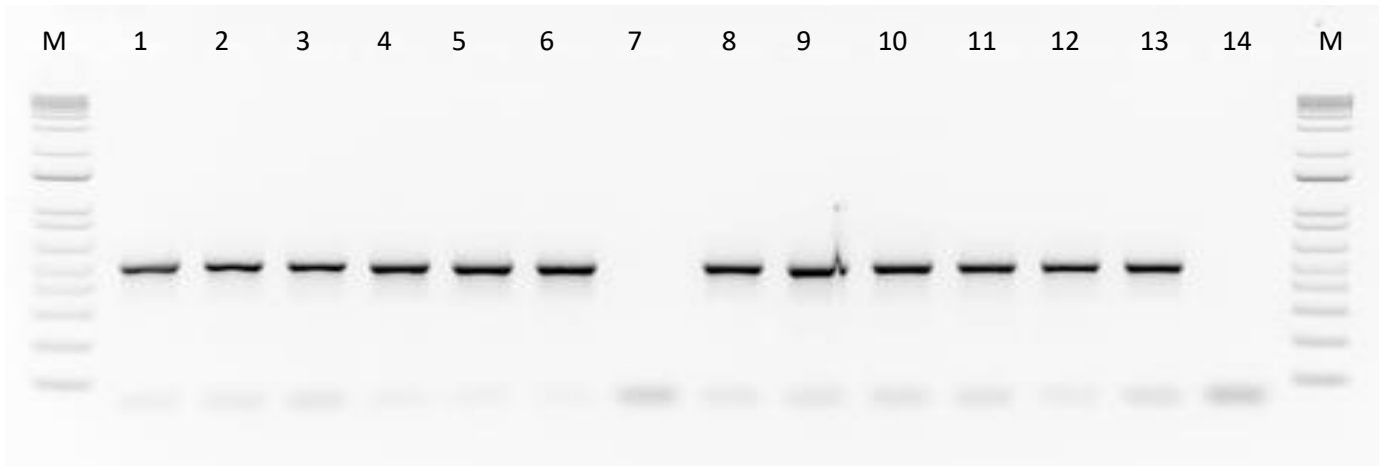


Figura 7. De izquierda a derecha: 1Kb plus, C12P2, C14P1, C31P1, C43P1, C46P1, C48P1, Control-, C22P4, C27P5, C1P2, C1P3, C1P4, C2P3, Control-, 1Kb plus

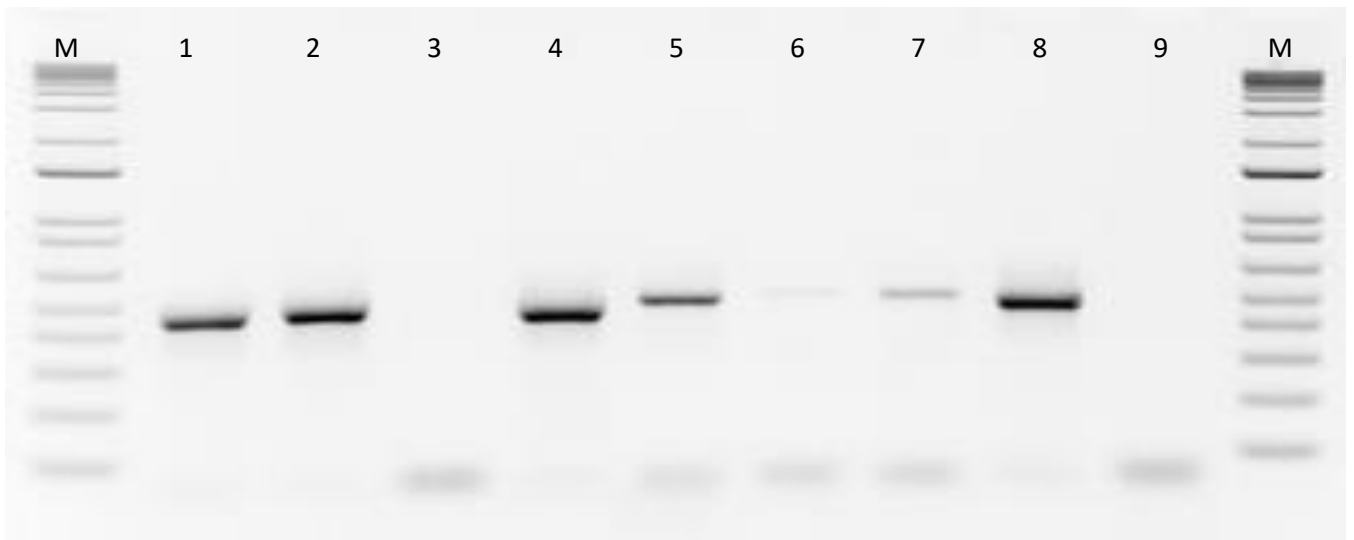


Figura 8. De izquierda a derecha: 1Kb plus, C2P4, C7P2, Control -, C2P1, C34P1, C35P1, C36P1, C1P1, Control -, 1Kb plus

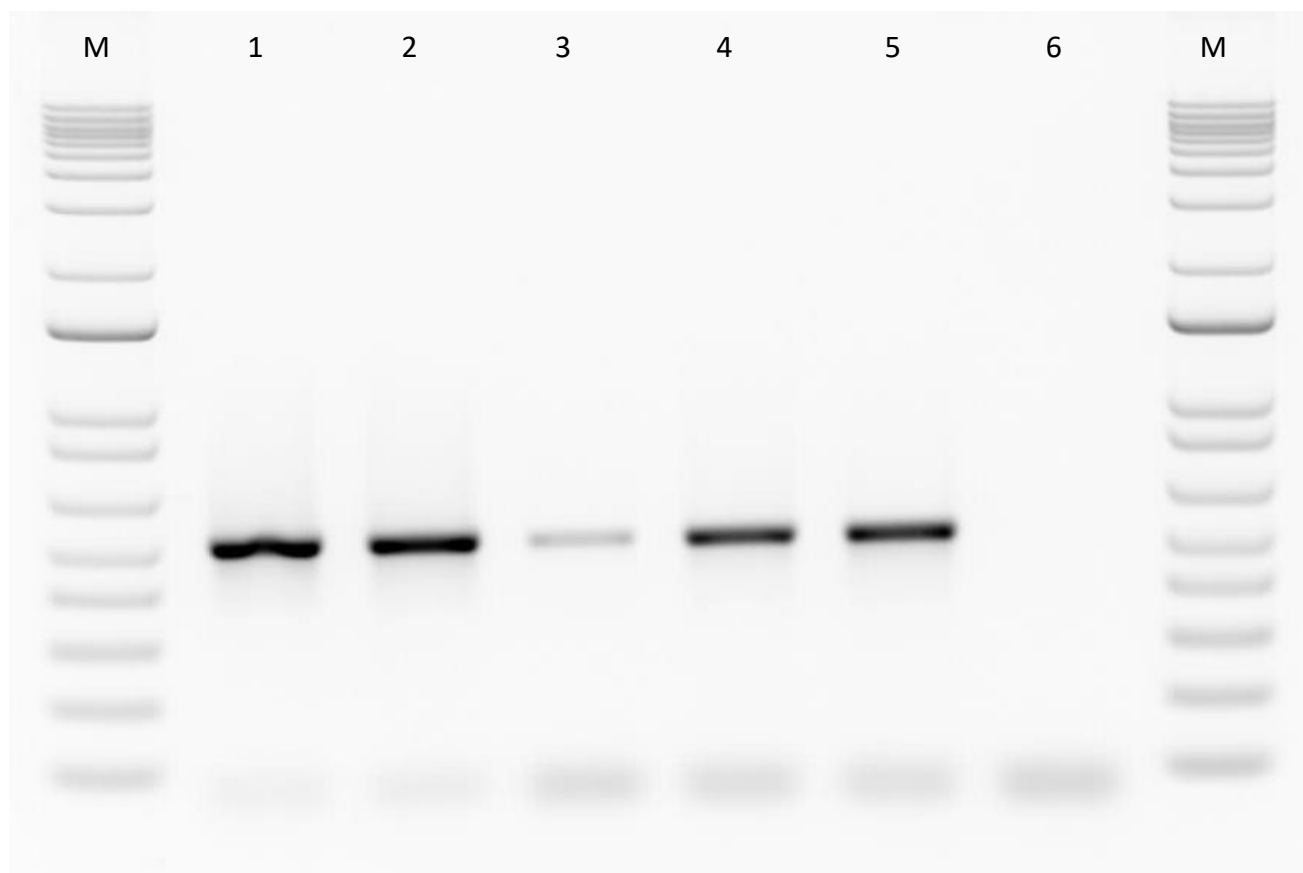


Figura 9. De izquierda a derecha: 1Kb plus, C38P2, C47P1, C39P1, C12P1, Control +, control -, 1Kb plus.

4.2 Purificación y dilución de muestras para envío a secuenciamiento.

Tabla 2. Concentración y calidad de los productos de PCR purificados y los valores de ADN y NFW para llegar a una concentración de 50 ng/ul.

Información de la muestra		Concentración	Calidad		Diluciones	
ID	#Campo	Ácido nucleico(ng/uL)	A260/A280	A260/A230	DNA	NFW
C1P1	1	83.1	1,779	1,445	18.0	12.0
C1P2	1	91.9	1,799	1,446	16.3	13.7
C1P3	1	89.5	1,792	1,355	16.8	13.2
C1P4	1	99.7	1,807	0,799	15.0	15.0
C2P1	2	109.7	1,812	1,390	13.7	16.3
C2P3	2	91.5	1,767	1,080	16.4	13.6
C2P4	2	111.2	1,808	1,536	13.5	16.5
C3P1	3	55.9	1,754	1,292	26.8	3.2
C4P3	4	96.8	1,779	1,379	15.5	14.5

C5P3	5	87.5	1,800	1,518	17.1	12.9
C7P2	7	115.0	1,796	1,499	13.0	17.0
C10P2	10	103.5	1,786	1,284	14.5	15.5
C11P1	11	98.2	1,809	1,556	15.3	14.7
C12P1	12	87.2	1,789	1,444	17.2	12.8
C12P2	12	111.6	1,821	1,552	13.4	16.6
C14P1	14	110.8	1,805	1,266	13.5	16.5
C17P1	17	131.8	1,816	1,494	11.4	18.6
C18P1	18	115.8	1,801	1,602	13.0	17.0
C20P1	20	121.2	1,812	1,367	12.4	17.6
C21P1	21	53.2	1,737	1,095	28.2	1.8
C22P2	22	111.4	1,824	1,572	13.5	16.5
C22P4	22	90.5	1,805	1,504	16.6	13.4
C24P1	24	120.6	1,805	1,577	12.4	17.6
C25P1	25	98.6	1,801	1,481	15.2	14.8
C26P1	26	129.2	1,825	1,645	11.6	18.4
C27P1	27	112.8	1,811	1,580	13.3	16.7
C27P5	27	116.4	1,814	1,543	12.9	17.1
C28P1	28	121.2	1,812	1,646	12.4	17.6
C29P1	29	106.8	1,791	1,265	14.0	16.0
C30P1	30	130.0	1,817	1,608	11.5	18.5
C31P1	31	112.6	1,810	1,472	13.3	16.7
C32P1	32	111.5	1,815	1,633	13.5	16.5
C33P1	33	128.9	1,798	1,278	11.6	18.4
C34P1	34	55.2	1,697	1,024	27.2	2.8
C36P1	36	39.7	1,610	0,805	37.8	-7.8
C37P1	37	115.9	1,800	1,566	12.9	17.1
C38P2	38	107.3	1,802	1,545	14.0	16.0
C39P1	39	114.5	1,818	1,597	13.1	16.9
C40P1	40	121.6	1,805	1,544	12.3	17.7
C41P1	41	124.2	1,805	1,632	12.1	17.9
C42P1	42	111.4	1,807	1,424	13.5	16.5
C43P1	43	106.9	1,812	1,412	14.0	16.0
C44P1	44	106.7	1,796	1,538	14.1	15.9
C45P1	45	110.4	1,806	1,572	13.6	16.4
C46P1	46	89.4	1,815	1,612	16.8	13.2
C47P1	47	100.7	1,796	1,498	14.9	15.1
C48P1	48	117.3	1,817	1,618	12.8	17.2
C49P1	49	96.5	1,796	1,199	15.5	14.5
C49P2	49	54.1	1,771	1,312	27.7	2.3

4.3 Análisis de las secuencias obtenidas del fragmento amplificado COI, alineamiento y obtención de las secuencias consenso.

Se envió 49 muestras a secuenciar por ambos sentidos (Forward y Reverse), haciendo un total de 98 reacciones. De estas, solo 48 resultaron con una buena calidad para ser consideradas en el análisis.

46 secuencias de individuos de *B. cockerelli* provenientes de campos de la provincia de Huancabamba y dos secuencias de individuos de colonias de *B. cockerelli* de CIP-Ecuador, incluidas en el ensayo como controles positivos del psílido de la papa.

A continuación, las 48 secuencias consenso en formato fasta:

>C1P1

```
AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACTGTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTAATAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA
```

>C1P2

```
AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACTGTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTAATAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA
```

>C1P3

```
AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACTGTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTAATAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA
```

>C1P4

```
AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACTGTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
```

TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTAAAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C2P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTATGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTAAAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C2P3

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTATGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTAAAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C2P4

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTATGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTAAAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C3P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTATGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTAAAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C4P3

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTATGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTG

GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C5P3

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C7P2

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C10P2

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C11P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C12P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT

TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C12P2

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C14P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C17P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C18P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C20P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTAACCAACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C21P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTAACCAACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C22P2

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTAACCAACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C22P4

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTAACCAACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C24P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA

CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAAACCTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C25P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAAACCTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C26P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAAACCTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C27P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAAACCTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C27P5

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAAACCTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C28P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG

TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C29P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C30P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C31P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C32P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C33P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTG

GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C34P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAATTTTATGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C37P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAATTTTATGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C38P2

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAATTTTATGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C39P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAATTTTATGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C40P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAATTTTATGTTGATTAGCAACTATT

TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C41P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCA

>C42P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C43P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCA

>C44P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AAATTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCCTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C45P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTAATAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C46P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTAATAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C47P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTAATAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C48P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAAACTTTATTAATAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C49P1

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTAATAATTTTATAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCCTGTTTACACTGG
GAGGTTTAAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTCTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA

CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

>C49P2

AATTCTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCATATATTTACAGTAGGTATAGATGTTGATTCTCGTGCCTA
TTTCACTTCCGCAACTATAATTATTGCTGTCCCTACAGGAATTA AATTTTTAGTTGATTAGCAACTATT
TATGGGATAAAAATATATTTTTCTCCAAGTATTATTTGATCTCTAGGATTCATTTTCTGTTTACTG
GAGGTTTAACAGGTGTAATTTTAGCAAATTTCAATTGACATTATTTTACATGACACATACTATGTAG
TAGCACATTTCCATTATGTTCTATCTATAGGGGCTGTATTTGCAATTATTGCTAGATTTATTAATTGATA
CCCTTTAATAACAGGAGTAATTATAAATAAACTTTATTA AAAACACAATTTATTAGTACTTTTATTGGT
GTTAACCTTACTTTTTTCCCCAACATTTCTTAGGACTCATA

4.5 Consulta mediante BLAST

Tabla 1. Secuencias de citocromo oxidasa subunidad I de *B. cockerelli* provenientes de la provincia de Huancabamba (Perú).

Muestra	Longitud	Porcentaje de identidad en el BLAST	Accesión con la que hizo match
C1P1	460	100%	JQ708094
C1P2	460	100%	JQ708094
C1P3	460	100%	JQ708094
C1P4	460	100%	JQ708094
C2P1	460	100%	JQ708094
C2P3	460	100%	JQ708094
C2P4	460	100%	JQ708094
C3P1	460	100%	JQ708094
C4P3	460	100%	JQ708094
C5P3	460	100%	JQ708094
C7P2	460	100%	JQ708094
C10P2	460	100%	JQ708094
C11P1	460	100%	JQ708094
C12P1	460	100%	JQ708094
C12P2	460	100%	JQ708094
C14P1	460	100%	JQ708094
C17P1	460	100%	JQ708094
C18P1	460	100%	JQ708094
C20P1	460	100%	JQ708094
C21P1	460	100%	JQ708094
C22P2	460	100%	JQ708094
C22P4	460	100%	JQ708094
C24P1	460	100%	JQ708094
C25P1	460	100%	JQ708094
C26P1	460	100%	JQ708094
C27P1	460	100%	JQ708094
C27P5	460	100%	JQ708094
C28P1	460	100%	JQ708094
C29P1	460	100%	JQ708094
C30P1	460	100%	JQ708094
C31P1	460	100%	JQ708094
C32P1	460	100%	JQ708094
C33P1	460	100%	JQ708094
C34P1	460	100%	JQ708094
C37P1	460	100%	JQ708094
C38P2	460	100%	JQ708094
C39P1	460	100%	JQ708094
C40P1	460	100%	JQ708094
C41P1	458	100%	JQ708094
C42P1	460	100%	JQ708094
C43P1	458	100%	JQ708094
C44P1	460	100%	JQ708094

C45P1	460	100%	JQ708094
C46P1	460	100%	JQ708094
C47P1	460	100%	JQ708094
C48P1	460	100%	JQ708094
C49P1	460	100%	JQ708094
C49P2	460	100%	JQ708094

4.6 Elaboración de un dendograma

Se construyó un árbol filogenético con 5 secuencias provenientes de individuos de la provincia de Huancabamba y dos secuencias de Ecuador, se consideró también incluir a las secuencias tipo correspondientes a los cuatro haplotipos mitocondriales de *B. cockerelli* según Swisher et al.(2014): Western (JQ708095.1), Central (JQ708094.1), Northwestern (JQ708093.1) y Southwestern (KC305359.1) . Adicionalmente se agregó al análisis una muestra de Ecuador (MK054304.1), determinada por Castillo et al. (2019) correspondiente al haplotipo central. Como se observa en la Figura 2 las secuencias de Huancabamba se agrupan con las secuencias de Ecuador y con la secuencia del haplotipo Central: JQ708094.1

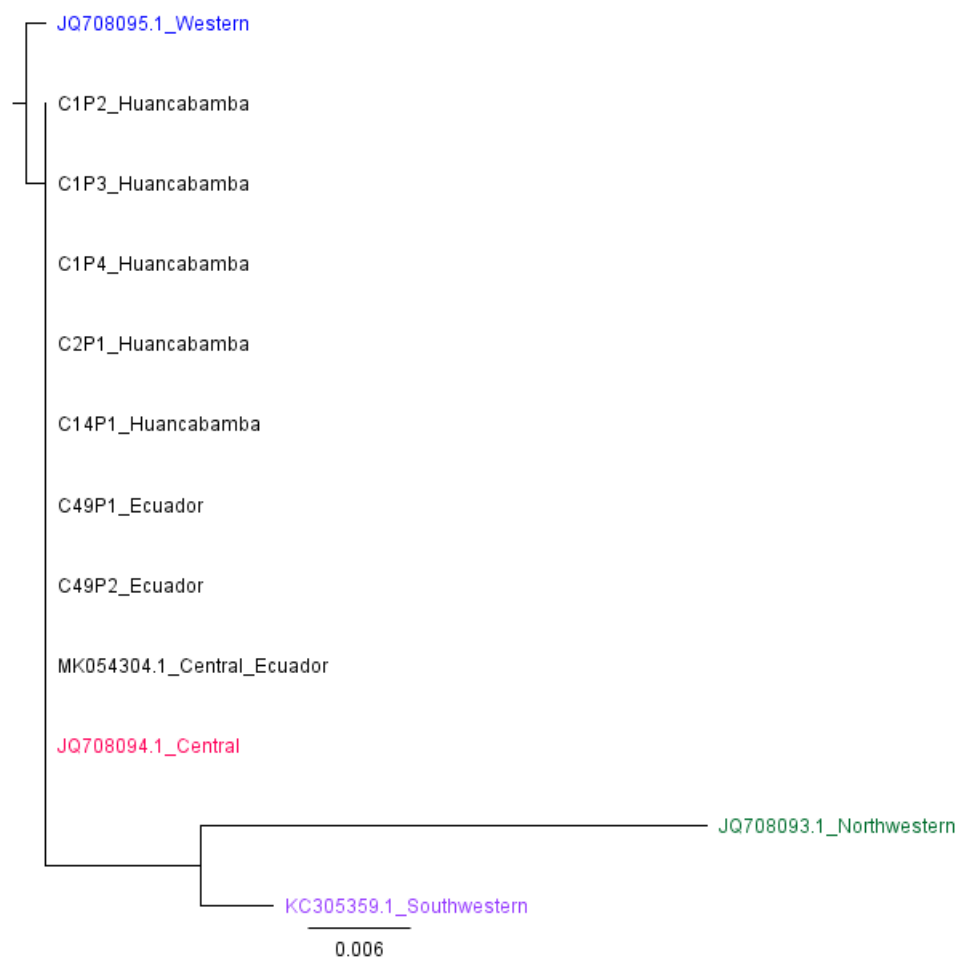


Figura 2. Árbol filogenético de las secuencias consenso de la región COI de *B. cockerelli*.

5. Conclusiones

- Se obtuvieron 48 secuencias consenso de la región Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) de muy buena calidad. 46 secuencias de individuos de *B. cockerelli* provenientes de campos de la provincia de Huancabamba y dos secuencias de individuos de colonias de *B. cockerelli* de CIP-Ecuador.
- Mediante el análisis de las secuencias se determinó que las 48 secuencias en estudio resultaron ser idénticas entre ellas, obteniéndose longitudes de 460 nucleótidos.
- En base a la consulta BLAST, las 48 secuencias consenso resultaron tener un 100% de similitud con la secuencia JQ708094 perteneciente al haplotipo central.
- El árbol filogenético construido con el método Neighbor-Joining agrupó a las secuencias de individuos de la provincia de Huancabamba con las secuencias del haplotipo central (MK054304.1 y JQ708094.1).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABI. (2022). *Bactericera cockerelli* (tomato/potato psyllid). En *In: Invasive Species Compendium*. CAB International. www.cabi.org/isc
- Castillo, C., & Llumiquinga, P. (2021). *Manual para reconocer e identificar al psílido de la papa (Bactericera cockerelli Šulc), en campo y laboratorio*. (Manual técnico N.º 121; p. 40). Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
- Castillo, C., Zhen, F., & Burckhardt, D. (2019). *First record of the tomato potato psyllid Bactericera cockerelli from South America*. 1(72), 85-91.
- Cerna, E., Beltrán, M., Ochoa, Y., Hernandez, O., & Delgado, J. (2021). *Bactericera cockerelli vector de Candidatus Liberibacter solanacearum, morfometría y haplotipos en poblaciones de México*. 26. <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/2939/4061>
- Crosslin, J. M., Swisher, K. D., & Hamlin, L. L. (2013). A Rapid Method for Preparation of Nucleic Acid Extracts from Potato Psyllids ¹ for Detection of ' Candidatus Liberibacter

Solancearum' and Molecular Analysis. *Southwestern Entomologist*, 38(1), 41-48.

<https://doi.org/10.3958/059.038.0112>

Pérez, W., Castillo Carrillo, C., Navarrete, I., Gamarra, H., Naccha, J., & Andrade-Piedra, J.

(2021). *Cartilla descriptiva del psílido de la papa*. International Potato Center.

<https://doi.org/10.4160/9789290606154>

Swisher, K. D., Henne, D. C., & Crosslin, J. M. (2014). Identification of a Fourth Haplotype of

Bactericera cockerelli (Hemiptera: Triozidae) in the United States. *Journal of Insect*

Science, 14(1). <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu023>