



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“Identificación de Orquídeas Epifitas del Ecuador
mediante DNA Barcoding.”**

Tesis previa a la obtención del título de:
Bioquímico-Farmacéutico

Autora:

Maritza del Carmen Carrión Jiménez

Directora:

Blga. María Lorena Riofrío

Loja – Ecuador
2009

CERTIFICACIÓN

Blga.
María Lorena Riofrío
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por Maritza del Carmen Carrión Jiménez, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, 22 de julio de 2009

Blga. María Lorena Riofrío
DIRECTOR DE TESIS

AUTORÍA

Los conceptos, ideas y resultados vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son de absoluta responsabilidad de su autor.

Maritza del Carmen Carrión Jiménez.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente guiándome siempre por el sendero del bien, y por darle a mi vida aquellos milagros que no permiten que me separe de su infinito amor.

A mis padres Alcides y María por brindarme siempre su amor, cariño y comprensión, por su lucha y entrega a la familia, quienes con sacrificio y amor supieron ayudarme en mi preparación profesional.

A mis hermanos Iván, Verónica, Jimmy, Roberth y Victoria por estar siempre juntos como familia, y mi sobrino Iván por mostrarme en su inocente mirada felicidad.

Maritza del Carmen Carrión Jiménez.

AGRADECIMIENTO

Expreso mi gratitud:

A la Universidad Técnica Particular de Loja que por medio del Centro de Biología Celular y Molecular y la Escuela de Bioquímica y Farmacia me ha permitido la oportunidad de formarme y prepararme integral y profesionalmente.

A todos los Docentes Investigadores del CBCM que son un ejemplo claro de compañerismo, responsabilidad y dedicación, y en especial a la Blga. María Lorena Riofrío y al Blgo. Juan Pablo Suarez por su valioso apoyo y asesoramiento en mi trabajo y en todo el proceso de esta investigación.

A mis compañeros y amigos por su compañía y apoyo en todos estos años de preparación personal y profesional. Y en especial a Paúl y Mónica por su invaluable amistad.

Maritza del Carmen Carrión Jiménez.

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS

Yo, Maritza del Carmen Carrión Jiménez declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad".

Maritza del Carmen Carrión J.
TESISTA

Blga. María Lorena Riofrío.
DIRECTOR DE TESIS

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRAC	2
I. INTRODUCCIÓN	
A. Diversidad, Distribución y Taxonomía de las Orquídeas.	3
B. Problemática de Identificación de las Subtribus Involucradas en este estudio (Pleurothallidinae, Laeliinae, Maxillariidae).	6
C. DNA barcoding, ventajas de las regiones matK, trnL-F, ITS.	8
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
- Sitio de estudio.	13
- Muestreo.	13
- Técnicas moleculares de identificación: Extracción de DNA, PCR, Purificación y Secuenciación de DNA.	14
- Análisis Filogenético	16
III. RESULTADOS	
- Identificación morfológica, distribución y taxonomía.	18
- Análisis Filogenético	20
IV. DISCUSIÓN.	27
V. CONCLUSIONES	32
VI. BIBLIOGRAFÍA.	33

ANEXOS	
- A1. ÁRBOLES FILOGENÉTICOS.	40
- A2. MORFOLOGÍA DE LAS ORQUÍDEAS.	48
- A3. TAXONOMÍA DE LAS ORQUÍDEAS.	54
- A4. FOTOS DE ORQUÍDEAS.	55
- A5. FOTOS DE ORQUÍDEAS SIN FLOR.	76
- A6. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA.	79
- A7. CONDICIONES PARA PCR.	82
- A8. FOTOS DE LOS PRODUCTOS DE PCR	83
- A9. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE DNA.	84
- A10. SECUENCIAS CONSENSO DE LAS ORQUÍDEAS.	85

DNA BARCODING, PARA LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ALGUNAS ORQUÍDEAS EPIFITAS DEL ECUADOR

Objetivos

Identificar molecularmente las orquídeas epifitas seleccionadas usando como herramienta DNA barcoding.

Objetivos específicos

- Obtener un patrón de secuencias de DNA para cada especie estudiada, que permita su identificación.
- Encontrar los primers adecuados que posibiliten el establecer diferenciación interespecífica.
- Estandarizar el protocolo de DNA barcoding para las especies estudiadas.

Hipótesis

Las regiones seleccionadas: ITS, matK, trnL-F son inespecíficas para las especies seleccionadas.

RESUMEN.

Las orquídeas en el Ecuador son un grupo de los más diversos e importantes de plantas vasculares. Amenazadas fuertemente por el tráfico y deforestación, además de que su taxonomía no está definida del todo, para su protección y conservación necesitamos conocerlas. El problema de identificación morfológica de las orquídeas en ausencia de floración nos hace recurrir a técnicas moleculares que permitan su eficaz identificación. Actualmente el DNA barcoding es una alternativa rápida y eficaz de identificación. Veintidós especies de tres Subtribus morfológicamente ya identificadas se analizaron filogenéticamente utilizando el DNA de tres regiones, dos de plastidos matK, trnL-F y una región de DNA nuclear ITS. Las secuencias analizadas de cada región fueron 14 para ITS, 13 para matK y 16 para trnL-F. Definiendo que la región parcial de matk presenta una buena variabilidad a nivel de especies, la región trnL-F fue una región poco informativa a nivel de especies para el género *Masdevallia*, y la región ITS no permitió obtener diferencias significativas entre especies. Precizando que la región apropiada para barcoding es matK por presentar mayor variabilidad. Sin embargo es necesario tener mayor cantidad de secuencias de la misma especie para cerciorarse de una correcta identificación molecular; y realizar un árbol multigenes para obtener más caracteres que comparar a nivel de especies.

Palabras claves. DNA barcoding, Pleurothallidine, Laeliinae, Maxillariinae, ITS, matK, trnL F.

ABSTRACT

Orchids are the most diverse and important group of vascular plants in Ecuador, but is subject to many threats. DNA barcoding is a technique in witch species identification is preformed by using DNA sequences from small fragment of the genome. In orchids is not possible to identify it without inflorescence. We test orchids of three different Subtribus and three different DNA sequences plastid gene matK, gene region trnL-F and intergenic spacer ITS. MatK show differences at the species level, trnL-F region was not informative to establishment differences to species level in *Masdevallia* genus; region didn't present significative differences between species. The results indicate that the plasmid gene matK is more informative for species identification. However, it is necessary to have a greater number of sequences of the same species to ensure acorret molecular identification, and a multigene tree is necessary for the have more characters to compare.

Keys word. DNA barcoding, Pleurothallidine, Laeliinae, Maxillariinae, ITS, matK, trnL F.

I. INTRODUCCIÓN

Diversidad, Distribución, Taxonomía de las Orquídeas:

En el Ecuador una de cada cuatro especies es de la familia Orchidaceae, identificándose en los bosques primarios del país cerca de 4187 especies y se estima que sobrepasarán las 5000, lo que representa cerca del 60% de las especies reconocidas en América del Sur y 40% de las especies del Continente Americano (Hirtz, 2004).

La situación del Ecuador para establecer la **variedad de orquídeas** es más dificultosa que en otras áreas geográficas. Hasta el momento se ha reconocido 214 géneros de orquídeas, pero el total en el país está lejano de conocerse. Después de quitar nombres sinónimos, 3.259 habrían sido reportadas en el país, pero sin ninguna duda este número es más grande que el total de especies en muchas familias de plantas. (Dodson, 2005).

La Orquídeas son diversas y variadas en cuanto a su hábitat, sistema reproductivo y tipo de polinización. De la familia Orchidaceae muchas son epifitas, pero incluyen hemiepifitas trepadoras, y grandes especies terrestres. Algunas especies de orquídeas son abundantes y están ampliamente distribuidas en todo el país, en contraste con otras especies de orquídeas que crecen en lugares pequeños y restringidos que les proporcionan humedad, nutrientes y sombra. Otro grupo de especies de orquídeas oportunista aparecen distribuidas en áreas como bordes y carreteras. Otras toleran moderadamente el área intervenida. Sin embargo, la mayoría de las orquídeas endémicas prefieren el bosque extenso y maduro de las estribaciones andinas. (Valencia, 2000).

Un grupo considerado de orquídeas tiende a distribuirse en el Neotropico en los Andes del Noroeste de Sudamérica y un 40% de todas ellas son epifitas lo que las constituye en el grupo más diverso y mejor representado de epifitas vasculares. **Las epifitas** son un componente importante en

los bosques pues están estrechamente relacionadas con el funcionamiento del ecosistema, siendo proveedoras de néctar, frutos o semillas para aves e insectos y hábitat para nidos de aves (Endara, 1999).

Dentro de las Subtribus con más especies en el Ecuador están la subtribu Pleurothallidinae, Laeliinae y Maxillariinae, (Dodson, 2001). En la **Subtribu Pleurothallidinae** de los trece géneros de orquídeas más grandes de la flora del Ecuador, siete se encuentran en esta Subtribu (*Pleurothallis*, *Lepantes*, *Stelis*, *Masdevallia*, *Dracula*, *Platystele*, *Brachionidium*) constituyendo un total de más de 1650 especies, con un porcentaje de 44% del total de especies reportadas con más ocurrencia en el Ecuador. (Dodson, 2002). De la Subtribu **Laeliinae** el género *Epidendrum* constituye el segundo género más grande de las orquídeas del Ecuador con una cantidad de 452 especies de 1200 especies en total. (Dodson, 2002). Y para la Subtribu **Maxillariinae** el género *Maxillaria* está entre los cuatro géneros más grandes del Ecuador con 200 especies reportadas de un total de 650. (Dodson, 2001).

El proceso de **extinción** de las orquídeas del Ecuador está siendo marcado por la destrucción de su hábitat, sumada al problema del tráfico de especies, por su alto valor comercial. (Endara, 1999). Esto es grave si se considera que la distribución de muchas orquídeas es conocida solo por una colección pobre, que en la mayoría de los casos corresponde a una localidad fuera del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (Valencia *et al.* 2000).

Para la identificación de las orquídeas se considera principalmente estructuras presentes en la inflorescencia, que pueden ser racimosas con flores axilares en el raquis y usualmente florecen de la base hacia arriba, en espiga, racimo, o panícula. A veces reducidas a una única flor, terminal o axilar. En condiciones primitivas la inflorescencia es terminal o lateral. Algunas veces la inflorescencia es condensada. También puede ser cymose o determinante.

Mientras la inflorescencia normal es producida por el axil de una hoja o brazo con excepciones, en el crecimiento simpodial la flor es producida de la parte opuesta de la hoja. (A2-fig1) (Dressler, 1982)

Las flores en general son hermafroditas (raramente unisexuales), en general cigomorfas (de simetría bilateral), usualmente resupinadas. Las flores están altamente especializadas en referencia a los polinizadores. Las flores pueden surgir, dependiendo del género y la especie, de la base de la hoja, del rizoma o de algún entrenudo del pseudobulbo. (Dressler, 1982)

El ovario es la base-inferior, las otras partes de la flor son completamente unidas con el ovario. En las epifitas el ovario no es diferenciado hasta el tiempo de floración y solo continúa su desarrollo si la flor es polinizada. (Dressler, 1982)

En las orquídeas los 6 estambres están fusionados con el pistilo y forman la columna (A2- fig.4). Las flores están formadas por *tres elementos externos llamados sépalos*, (dos laterales y uno dorsal), y *tres elementos internos llamados pétalos*, (el inferior forma el labio o labelo caracterizado por mayor tamaño y color más intenso). (Judd *et al*, 2007, Simpson, 2005). A veces los 2 sépalos laterales se encuentran fusionados en un solo elemento llamado "*sinsépalo*". Los pétalos están siempre separados, a veces punteados o variadamente coloreados. El llamado "*labelo*" es el pétalo medio, a menudo es trilobulado o de una forma inusual, y crestas carnosas o un espolón basal, y muchas veces con un patrón de colores diferente que los demás. (A2-fig2; 3). (Dressler, 1982)

La **parte femenina** de la columna es una cavidad que se llena con viscidia, una sustancia muy esponjosa. La **parte masculina** está al final de la columna y se llama antera. La antera es una estructura esponjosa dividida en cuatro bolsas o loculos esporogenos longitudinales. El **rostelum** es una

membrana que separa la parte femenina de la antera. (A2-fig.5-6) (Dressler, 1982)

Las orquídeas transformaron al **polen** en granos. El polen se encuentra en tétradas en la mayoría de las especies, en forma de másulas o monedas, usualmente agrupado de 2 o 4 (o pueden ser 1-12) (A2-fig.7-8). (Dressler, 1982)

El **fruto** es una cápsula loculicida, que se abre mediante 3 o 6 ranuras longitudinales (a veces 1 sola), raramente una baya. Las semillas son diminutas y numerosas. (Dressler, 1982)

Hay gran dificultad para establecer una buena taxonomía de las orquídeas ya sea por criterios adicionales obtenidos de las relaciones filogenéticas que podrían ser no uniformes resultando taxas bien divididas y otras no divididas del todo; o por la estructura de las Subfamilias o Tribus de las orquídeas que está aún en estado de flujo, apareciendo especies a menudo muy similares siendo muy dificultosas para distinguir con seguridad. Otro problema es que esta familia es muy grande siendo poco manejable para los botánicos especializados en orquídeas. Adicional a esto es que las orquídeas son difíciles de identificar cuando no están en floración. Todo esto es muy preocupante para el campo botánico teniendo en algunos casos que evitarlo. (Dodson, 2005)

Claves antiguas de clasificación se basaban en características comunes y variables como tamaño de la espata, forma de la hoja, longitud del racimo, etc., que permitieron agrupar a especies relacionadas. Claves recientes se basan el número de polinio, pero si el polinio está ausente en el espécimen en cuestión surgen los problemas (Luer, 1986).

La morfología de la **Subtribus Pleurotallidinae** se caracteriza por tener pseudobulbos; tallos unifoliales; hojas duplicadas a menudo flexibles, articuladas. Inflorescencia terminal, raramente lateral; simple o fasciculado dístico. Flores resuspínadas o no, con una articulación entre el ovario y el

pedicelo; columna pequeña o alargado, a menudo con un pie distinto, antera apical y titular o dorsal y erecta, polinia claviforme, 8, 6, 4, 2, a menudo con un diminuto viscidium (cuando la antera es erecta); estigma entero o en dos lóbulos, Capsula puede tener dos válvulas iguales (A2-fig.9). (Dressler, 1982; Luer, 1986; Pridgeon et al, 2001).

Mientras que la **Subtribu Laeliinae** está caracterizada por tener tallos delgados o formando pseudobulbos, estos suelen ser de varios internudos. Las hojas son distichous o terminal sobre pseudobulbos, duplicadas, usualmente general articuladas. Inflorescencia terminal o raramente lateral; simple o ramificada; de una a muchas flores; en espiral o dística. Flores diminutos o largas, resuspinate o no; flores pueden tener un tipo de canalículos nectarios; columna pequeña o alargada, a menudo con alas, puede tener un pie de columna; antera terminal y titular o erecta; polinias laterales y aplanadas u ovoides de 8, 6, 4, o 2, con prominentes caudículas; estigma entero, a veces con un viscidium (A2-fig.10). (Dressler, 1982, Van Den Berg *et al*, 2000; Forster *et al*, 2007).

En la **Subtribu Maxillariinae** su morfología está constituida por pseudobulbos de un entrenudo, o tallo delgado, corto o alargado. Hojas dísticas o espirales, duplicadas y articuladas. Inflorescencia lateral, con una sola flor. Flores pequeñas o grandes; labio generalmente abisagrado, a veces formando un nectario incrustado con el pie de la columna; columna delgada o corta; antera terminal, opercular, con pequeñas fracciones, cuatro polinias superpuestas, con viscidium y un estípite más o menos desarrollado, estigma entero. (A2-fig.11). (Dressler, 1982, Whitten et al. 2007)

Problemática de Identificación de las Subtribus:

En la Subtribu Pleurothallidinae la problemática en la morfología es que presenta rasgos relativamente homogéneos, que con solo una nomenclatura es improbable

revelar la inmensa cantidad de caracteres requeridos para obtener una exacta relación intragénero (Pridgeon *et al*, 2001).

Para la Subtribu Laeliinae según la sistemática de Dresler (1993), agrupa a las Subtribus Laeliinae, Pleurothallidinae, Apsophyllinae, Meiracyllinae y Sobraliinae dentro de la "New World Epidendreae" pero parece ser separada de las demás por el allanado lateral de la pollinia. Por otra parte en esta Subtribu también hay grandes divisiones a nivel de género, obteniendo de estas divisiones nuevos géneros que a la vez pasan a ser parte de otras Subtribus, como por ejemplo la Subtribu Ponerinae que usa géneros con columna erguida donde entran algunos géneros de Laeliinae. Otra dificultad para una adecuada identificación de la Subtribu Laeliinae es que varios géneros como *Catleya* presentan hibridación natural intra e íntergénero. (Van Den Berg *et al*, 2000)

En la Subtribu Maxillariinae su morfología floral relativamente estereotipada y gran diversidad de hábitat vegetativo ha creado inestabilidad taxonómica dentro del grupo. Estudios moleculares han demostrado que siete de sus géneros están dentro del grupo polifilético *Maxillaria* (Whitten *et al*. 2007).

DNA barcoding:

En las últimas décadas se han desarrollado algunas técnicas moleculares que permiten la identificación precisa de cualquier especie de organismo. Así, en este estudio para la identificación rápida de orquídeas que no están en floración la herramienta a utilizar es el código de barra de ADN "DNA barcoding" donde se emplea la variabilidad nucleotídica existente en regiones cortas y estandarizadas del genoma, como auxiliar en la identificación y descubrimiento de especies. (Hebert *et al* 2003; Hebert *et al* 2005; Ratnasingham *et al* 2007). El propósito del barcode es la identificación de especies, y especialmente contribuir a descubrir la diversidad orgánica previamente no detectada a nivel de especies. El uso de un gran número de caracteres provenientes de las secuencias de DNA en la taxonomía se ha propuesto como una estrategia viable para contribuir a establecer un inventario

total de especies vivas (Hebert *et al*, 2005). Esta técnica puede aplicarse a materiales fragmentarios de plantas y ser utilizado además como auxiliar para determinar la diversidad de especies para estudios de demografía, ecología y análisis forense. La aplicación forense es importante para poder controlar el aprovechamiento ilegal de plantas. (Hebert *et al* 2007)

En grupos de animales el gen *cox1*, que codifica para la enzima mitocondrial Citocromo oxidasa 1, a sido ampliamente usado como código de barra genético porque es fácil de secuenciar y altamente informativo, permitiendo en algunos casos la variación intraespecifica (Hebert *et al*, 2005). Sin embargo la selección del código de barra genético para las plantas es más difícil debido a la tendencia evolutiva que presentan los tres genomas de las plantas. En el caso del DNA nuclear las poliploidias con frecuencia resulta de copias múltiples y heterogéneas de los marcadores potenciales, El DNA mitocondrial es propenso a rearreglos, tiene una sustitución muy baja y es muy susceptible a migrar al núcleo, el genoma de los cloroplastos es haploide como el mitocondrial, pero presenta una tasa elevada de sustitución y poca recombinación, lo cual lo hace mas adecuado como fuente de carácter para rastrear eventos de interés. (Salazar *et al*, 2007). Las regiones que se utilizaron para barcoding en este trabajo son DNA de cloroplastos *matK*, *trnL-F* y DNA nuclear ITS. La región *matK*, *trnL* intron e ITS han sido planteadas para la estandarización de protocolo de DNA barcoding (Chase *et al*, 2007).

MatK (maturase K). En la sistemática de plantas, el gen *matK* se ha surgido recientemente como un gen valioso debido a su signo filogenético alto comparado con otros genes usados en este campo (Muller *et al.*, 2006). Las 1500bp del gen *matK* están alojadas entre dos intrones que son interrumpidos por los exones 5' y 3' de *trnK* en la larga y singular copia de cloroplastos de la mayoría de las plantas verdes. La región 3' es relativamente conservada y la región 5' menos conservada ofreciendo dos conjuntos de caracteres que se pueden utilizar

en diferentes niveles taxonómicos; proporcionando información molecular para resolverse las relaciones filogenéticas de poca profundidad a los niveles mas profundos (Hilu *et al*, 2003; Cameron, 2005). El análisis filogenético hecho con secuencias de matK para angiospermas básales demostraron que matK contribuye a mas características de parsimonia informativo y significativamente mas estructura filogenética, que el conservado gen rbcL. Las Inserciones y deleciones (indels) son frecuentes en el matK, aunque estos indels ocurren principalmente en los múltiplos de tres, manteniendo el marco de lectura, codificando **Maturases** que son enzimas que catalizan no autocatalíticos intrones suprimidos por RNAs prematuros; además de ser requeridos para la función normal de la fotosíntesis y para la postranscripción como factor de empalme en los cloroplastos. (Barthet *et al*, 2003). En las orquídeas la proporción rápida de sustitución, la presencia de indels y el cambio de lectura como los casos de codones de la parada prematuro, incitó a algunos investigadores para sugerir que los matK no pueden ser funcionales para codificar proteínas considerándolo como un pseudogen en estas plantas. (Whitten *et al.*, 2000)

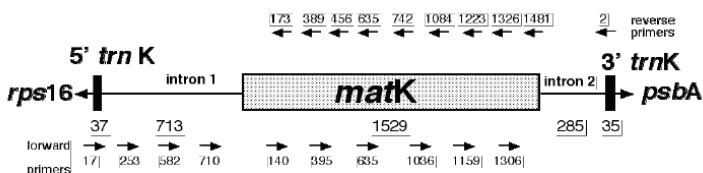


Fig 2. Estructura de la región matK (maturase K) de angiospermas

trnL-F (región no codificada)

La región del trnL-F contiene el gen trnL que es agrietado por un grupo I intron, un espaciador intergénico, y el exon del trnF. El grupo I intron es caracterizados por una gran conservación

en la estructura central que codifica un sitio activo mediador de su mismo empalmamiento en el pre tRNA (Bakker *et al*, 2000). En las plantas, el intron del trnL muestra una secuencia conservada en la región flaqueante al llegar a los exones del trnL, considerando que la parte central es muy inconstante. La región no codificada exón de trnL (UAA) y exón trnF (GAA) está usándose cada vez más a nivel de especies para la reconstrucción filogenética, entendiéndose como un buen modelo de sustitución deseable (Borsch *et al*, 2003). Dentro del espaciador intergénico, ningún elemento secundario-estructural se ha encontrado que podría servir para empalmar los dos puntos, indicando que el trnL y trnF probablemente son cotranscritos (Bakker, 2000). Un rasgo general de cpDNA en las regiones espaciadoras es la frecuencia de indels de la que puede derivarse deleciones o duplicación sucesivas adyacentes que ocurre en las regiones no repetitivas de la parte más espacial (Shaw *et al*, 2007).

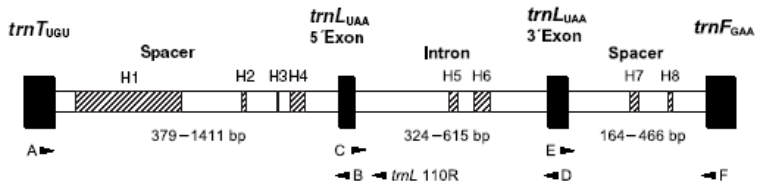


Fig. 3 Estructura de la región trnT-trnF de angiospermas y gimnospermas

ITS (Subunidad Interna Transcrita)

Los genes de DNA nuclear ribosomal (rDNA) de las grandes plantas son organizados en largos tandem repetidos, cada uno consiste en una sola región transcrita que va desde 18S, 5.8S, 26S rDNAs, dos pequeños espaciadores interno

transcrito (ITS1, ITS2), y un gran espaciador intergénico no transcrito externo. Los espaciadores ITS1 ITS2 han mostrado constituir una valiosa fuente de caracteres moleculares para reconstruir la filogenética de la planta desde el nivel de género y a nivel familiar. (Douzery *et al*, 1999). Las secuencias 5.8S-ITS2 pueden proporcionar información a niveles filogenéticos mas profundos (Hershkovitz *et al*, 1996). El ITS1-5.8S-ITS2 sitio se ha usado para estudiar previamente las relaciones entre grupos de Orchidaceae, incluso los Cypripedioides, Orchideae (Bateman *et al* 1997, Pridgeon *et al*, 1997), y el género *Platanthera* (Hapeman *et al*, 1997). En la actualidad, otra única sucesión de ADN estudiada para orquídeas ha involucrado los genes del plastidos. (Salazar *et al*, 2007).

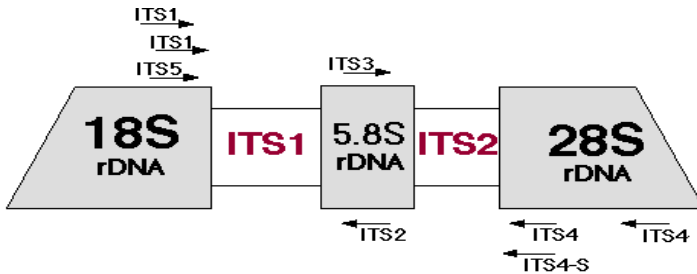


Fig 4. Estructura de la región ITS (subunidad interna transcrita)

Para todo lo mencionado anteriormente ante la problemática de identificación de orquídeas en ausencia de floración, nosotros propusimos esta alternativa de DNA barcoding. Y planteamos las siguientes preguntas de investigación. ¿Es posible identificar las orquídeas epifitas sin floración? ¿Cuáles son los primers mas adecuados para establecer diferencias a nivel de especies?

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. Las orquídeas incluidas en el estudio están presentes en el Banco de Conservación de Orquídeas de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Muestreo. Se seleccionaron 22 especies de orquídeas epífitas de difícil identificación en ausencia de floración (Ver tabla 1 y Anexo5) Se identificó morfológicamente a las orquídeas de estudio usando las claves taxonómicas existentes (para la mayoría de los casos) y se las marco para su reconocimiento posterior.

Tabla 1. Orquídeas seleccionadas pertenecientes a las Subtribus Pleurothallidinae, Laeliinae, Maxillariinae

Subtribu	Género	Especie	Código
Pleurothallidinae	<i>Dracula</i>	<i>D. dalessandroi</i>	1MC
Pleurothallidinae	<i>Dracula</i>	<i>D. mopsus</i>	2MC
Pleurothallidinae	<i>Dracula</i>	<i>D. simia</i>	3MC
Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. citrinella</i>	4MC
Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. guttulata</i>	5MC
Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. nidifica</i>	6MC
Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. rosea</i>	7MC
Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. setacea</i>	8MC
Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. strobilii</i>	9MC
Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. xanthina</i>	10MC
Pleurothallidinae	<i>Pleurothallis</i>	<i>P. niveoglobula</i>	11MC
Pleurothallidinae	<i>Stelis</i>	<i>S. concinna</i>	12MC
Pleurothallidinae	<i>Stelis</i>	<i>S. hallii</i>	13MC
Pleurothallidinae	<i>Stelis</i>	<i>S. superbiens</i>	14MC
Pleurothallidinae	<i>Stelis</i>	<i>S. sp.</i>	15MC
Laeliinae	<i>Epidendrum</i>	<i>E. falcisepalum</i>	16MC
Laeliinae	<i>Epidendrum</i>	<i>E. madsenii</i>	17MC
Laeliinae	<i>Epidendrum</i>	<i>E. rhopalosteale</i>	18MC
Laeliinae	<i>Epidendrum</i>	<i>E. sp.</i>	19MC
Laeliinae	<i>Epidendrum</i>	<i>E. rhopalosteale</i>	20MC
Maxillariinae	<i>Maxillaria</i>	<i>Max. confusa</i>	21MC
Epindendrinae	<i>Nanodes</i>	<i>N. medusae</i>	22MC

Técnicas moleculares:

Extracción de DNA:

Para la extracción de ADN, para cada muestra se tomo un segmento de hoja sana, de aproximadamente 1cm², se lo congeló con nitrógeno líquido y se lo trituro. El DNA fue extraído usando el kit PureLinKTM Plant Total DNA Purification Kit (Promega) (Anexo A6). El ADN extraído fue conservado a -80 grados centígrados hasta ser utilizado.

Amplificación:

El volumen de reacción de la PCR fue de 50 ul, con concentraciones de 1.5 mM MgCl₂, 200 mM de cada dNTP, 0.5 mM de cada primer, Bovine Serum Albumin (BSA-SIGMA) 1%, 1U Taq polimerasa (promega), con un buffer free Mg 10 X de amplificación modificado según Suárez *et al.* (2006). La cantidad de ADN empleada fue de 5ul. (Anexo A7)

Los primers o cebadores utilizados para la amplificación de DNA de cloroplastos fueron: matK 19F/88R (5'-CGT TCT CAT ATT GCA CTA TG-3' /5'-TMT TCA TCA GAA TAA GAG T-3'), y el trnL-F c/f (5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG -3' /5'-ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG-3') (Pridgeon *et al.*, 2001). Para la amplificación de DNA nuclear se utilizó primers universales ITS1/ITS4 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' /5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Suárez *et al.*, 2006).

Las condiciones de PCR variaron para cada primer empleado:

Para la región matK: Desnaturalización inicial a 94°C por 1 min; 30 ciclos, cada ciclo consiste en un paso de desnaturalización a 94°C por 30s; anillamiento dependiendo de la combinación de primers por 45°C por 30s y extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 7 min para finalizar la PCR (Pridgeon *et al.* 2001)

Para la región trnL-F. Desnaturalización inicial a 94°C por 1 min; 30 ciclos, cada ciclo consiste de un paso de desnaturalización a 94°C por 30s; anillamiento dependiendo de la combinación de primers entre 48°C y 50 °C por 30s y extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 7 min para finalizar la PCR (Pridgeon *et al.* 2001)

Para la región ITS. Desnaturalización inicial a 94°C por 3 min; 35 ciclos, cada ciclo consiste de un paso de desnaturalización a 94°C por 30s; anillamiento dependiendo de la combinación de primers por 40°C o 45°C por 45s y extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 7 min para finalizar la PCR (Suárez *et al.* 2006).

Los resultados de la amplificaciones de PCR se examinaron por medio de electroforesis, cada reacción se la analizo con 5µL de producto de PCR (+ 2 µL de azul de bromofenol– 6x loading solution) en geles de Agarosa 0.7% (128 V, 300 mA, 20 min), teñido en una solución de bromuro de etidio 0.5 µg ml⁻¹ durante 20 min y un lavado final de 15 min. Se visualizó la gel en un transiluminador a 312nm al 100% Y se fotografió usando la cámara digital Kodak modelo DC 290 KOD.(Anexo A8)

Los productos de PCR que se observaron como bandas claras fueron purificados usando el kit de purificación de DNA y protocolo QIAquick PCR Purification Kit Protocol (Qiagen) (Anexo A8). Los productos de DNA fueron secuenciadas en la empresa Macrogen (Seoul, Korea), usando los primers matK (19F y 881R), para trnL-F (c y f), y ITS (ITS1 y ITS4). La edición de secuencias fue realizada con el programa Sequencher 4.6 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) (Anexo A10). Para determinar el posible organismo al que pertenece la secuencia obtenida, se hizo una comparación de las tres regiones (matK, trnL y ITS) utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) del GenBank.

Análisis filogenético:

Todas las secuencias fueron inicialmente alineadas con MAFFT y las relaciones filogenéticas fueron estimadas mediante PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) que es un software para la creación rápida de árboles filogenéticos.

Para el alineamiento de las secuencias se utilizó MAFFT la versión 5 con la opción L-INS-I, estrategia usada para un alineamiento global; pues utiliza alineamientos globales de aproximación con un FFT (Fast Fourier Transform), el alineamiento resultante se lo carga en BEdit para exportarlo con formato Fasta y de esta manera cargarlo en el Se-Alv2.0a11 carbon, en este último se ordena las secuencias, se anulan las secuencias malas y se decide las regiones ambiguas que serán omitidas para los siguientes pasos tomando en cuenta regiones conservadas e informativas, es decir aquellas que para una misma característica conservan similitud pero que presenten diferencias al comparar entre una secuencia y otra, finalmente se exporta con formato Nexus para ejecutarlo en PAUP.

Elegimos el **outgroup** (grupo externo) especies de la tribu Neottieae de las lower Epidendroide (Cameron, *et al*, 1999) que sirve para comparación y enraizamiento de las secuencias obtenidas estimando caracteres similares. Con ello se asume que los caracteres que se hallan en los outgroups son más parecidos a las secuencias restantes del grupo a analizar (**ingroup**) por la divergencia que existe entre ambos.

El software Modeltest 3.5 (Posada, 1998) fue utilizado para calcular el modelo de sustitución de bases que mejor se ajuste a los alineamientos usando, se ejecutó un Bio Neighbor-joining para una rápida revisión del árbol con las exclusiones establecidas y para la creación del árbol filogenético, análisis de resultados y el cálculo de los valores de soporte de cada clado se ejecutó con un análisis phylm – bootstrap con 1000 replicas, este programa presentará una mesa que ilustra las

opciones disponibles para el análisis filogenético, tomando las opciones del ejemplo para un cuarteto el análisis de máximo-probabilidad enigmático de una alineación de ADN. (Michael, 2006)

III. RESULTADOS

Identificación morfológica, distribución y taxonomía:

Las especies estudiadas se identificaron usando las claves taxonómicas de Dodson (Dodson & R. Escobar, Native Ecuadorian Orchids 1, 1993.; Dodson, Native Ecuadorian Orchids 2, 2001.; Dodson, Native Ecuadorian Orchids 3, 2002.; Dodson, Native Ecuadorian Orchids 4, 2003.; Dodson, Native Ecuadorian Orchids 5, 2005., basadas en los caracteres florales (ver tabla 2 y anexos A4).

Las especies estudiadas presentan una categoría de amenaza, siendo además endémicas en su mayoría, están distribuidas especialmente en la región sur del país. (ver tabla 3.y gráfico 1)

Tabla 2. Clasificación de las Orquídeas

Familia	Subfamilia	Categoría	Tribu	Subtribu	Género	Especie
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Dracula</i>	<i>D. dalessandroi</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Dracula</i>	<i>D. mopsus</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Dracula</i>	<i>D. simia</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. citrinella</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. guttulata</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. nidifica</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. rosea</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. setacea</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. strobilii</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Masdevallia</i>	<i>M. xanthina</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Pleurothallis</i>	<i>P. niveoglobula</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Stelis</i>	<i>S. concinna</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Stelis</i>	<i>S. hallii</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Stelis</i>	<i>S. superbians</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Pleurothallidinae	<i>Stelis</i>	<i>S. sp.</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Laeliinae	<i>Epidendrum</i>	<i>E. falcisepalum</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Laeliinae	<i>Epidendrum</i>	<i>E. madsenii</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Laeliinae	<i>Epidendrum</i>	<i>E. rhopalostele</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Laeliinae	<i>Epidendrum</i>	<i>E. sp.</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Epidendreae	Epidendrinae	<i>Nanodes</i>	<i>M. medusae</i>
Orchidaceae	Epidendroideae	higher Epidendroideae	Maxillariae	Maxillariinae	<i>Maxillaria</i>	<i>M. confusa</i>

Tabla 3. Estado de las orquídeas en el Ecuador según el Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador; Native Ecuadorian Orchids.; y CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres).

Especie	Ubicación	Grado de Amenaza	Bosques donde se desarrollan
<i>Dracula dalessandroi</i>	Zamora Chinchipe, Loja.	En peligro (CITES)(Libro Rojo)	Bosque andino alto: 2000-300m
<i>Dracula mopsus</i>	Manabí, El Oro, Cotopaxi.	Vulnerable (Libro Rojo)	Bosque litoral, hasta bosque andino: 0- 1500m
<i>Dracula simia</i>	Zamora Chinchipe, Morona Santiago	Vulnerable (Libro Rojo)	Bosque andino bajo: 1500-2000m
<i>Masdevallia citrinella</i>	Zamora Chinchipe.	En peligro (CITES)	Bosque andino alto: 1500-2000m
<i>Masdevallia guttulata</i>	Morona Santiago, Pastaza, Zamora Chinchipe.	En peligro (CITES)	Pie montano, hasta bosque andino bajo: 500-2000m
<i>Masdevallia nidifica</i>	Pichincha, Manabí, Guayas, El oro, Imbabura, Cotopaxi, Azuay.	En peligro (CITES)	Bosque litoral, hasta bosque andino: 0- 1500m
<i>Masdevallia rosea</i>	Azuay, Loja, Zamora Chinchipe.	En peligro de extinción (CITES)	Bosque andino lato: 2000-300m
<i>Masdevallia setacea</i>	Morona Santiago	No reportada	Bosque andino bajo: 500-2000m
<i>Masdevallia strobilii</i>	Zamora Chinchipe	En peligro (CITES)	Bosque andino bajo: 1000m a 2000m
<i>Masdevallia xanthina</i>	Carchi, Imbabura, Napo, Pastaza, Morona Santiago.	En peligro (CITES)	Bosque amazónico, hasta bosque andino bajo: 500-2000m
<i>Pleurothallis niveoglobula</i>	Napo, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe.	Precaución menor (Libro Rojo)	Bosque amazónico, Pie montano hasta bosque andino bajo: 500-2000m
<i>Stelis concinna</i>	Pichincha, Chimborazo, Zamora.	No reportada	Pie montano hasta bosque andino bajo: 500-2000m
<i>Stelis hallii</i>	Azuay, Loja, Zamora	No reportada	Pie montano hasta bosque andino bajo: 500-2000m
<i>Stelis superbiens</i>	Manabí, Carchi, Pichincha, Carchi, Sucumbíos, Morona Santiago, Zamora Chinchipe.	No reportada	Pie montano hasta bosque andino bajo: 500-2000m
<i>Stelis sp</i>	Zamora Chinchipe.		Pie montano hasta bosque andino bajo: 500-2000m
<i>Epidendrum falcisepalum</i>	Morona Santiago, Zamora Chinchipe, Loja	En Peligro (Libro Rojo)	Bosque andino bajo: 1500m-2000m
<i>Epidendrum madsenii</i>	Tungurahua, Napo, Morona Santiago, Zamora Chinchipe, Loja	No reportadas	Bosque andino bajo: 1500m-2000m
<i>Epidendrum rhopalosteale</i>	Napo, Zamora Chinchipe	No reportada	Bosque andino bajo: 1500m-2000m
<i>Epidendrum sp</i>	Vía Loja a Zamora		Bosque andino bajo: 1500m-2000m
<i>Maxillaria confusa</i>	Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y Colombia	No reportada	En elevaciones de 0 a 1450 m
<i>Nanodes medusae</i>	Azuay, Loja.	En peligro (CITES)	Bosque andino alto hasta páramo arbustivo: 2500m-3000m

Análisis filogenético

Los productos de PCR obtenidos fueron de buena calidad. Se examinaron las tres regiones para las 22 muestras; para la región ITS se obtuvo productos de 15 muestras, para región trnL-F productos de 19 muestras y para la región matK se obtuvo productos de 21 muestras. Los mismos que fueron purificados y enviados para ser secuenciados en la empresa Macrogen (Seoul-Korea). Se obtuvieron 14 secuencias óptimas para ITS, 13 para matK y 16 para trnL-F. Las secuencias consenso para cada muestra fueron efectuadas utilizando el programa Sequencer 4.6. Una identificación molecular preliminar de las orquídeas se realizó utilizando estos consensos obtenidos de las secuencias y comparando por búsquedas en BLAST (GenBank nucleotide database) basados en cada región, teniendo como resultado final la secuencia más similar de esta base de datos (ver Tablas 4; 5; 6). Se debe considerar que las plantas que se identificaron morfológicamente en este trabajo no están todas incluidas en la base de datos del GenBank.

La búsqueda en BLAST produjo como resultado las secuencias más similares a las orquídeas estudiadas. En la región ITS la base de datos del GenBank tiene secuencias de algunas especies que se caracterizaron morfológicamente en este estudio. Sin embargo los resultados al comparar las secuencias del GenBank con nuestras secuencias correspondían a los mismos géneros difiriendo en algunas especies.

Tabla 4. Secuencias con mayor similitud en la **región ITS** a las Orquideas secuenciadas obtenidas de la búsqueda en el GenBank utilizado Blast.

Código	Nombre morfológico	Busqueda en Blast	Número accesión al GenBank	Similitud
1MC	<i>Dracula dalessandroi</i>	<i>Dracula fugifera</i>	EF372372	538/538 (100%)
2MC	<i>Dracula mopsus</i>	<i>Dracula mopus</i>	EF372389	406/408 (99%)
3MC	<i>Dracula simia</i>	<i>Dracula fuligifera</i>	EF372372	633/633 (100%)
4MC	<i>Masdevallia citrinella</i>	<i>Masdevallia citrinella</i>	AF262774	
5MC	<i>Masdevallia guttulata</i>	<i>Masdevallia harlequina</i>	DQ923790	546/548 (99%)
6MC	<i>Masdevallia nidifica</i>	<i>Masdevallia saltatrix</i>	AF262793	598/600 (99%)
7MC	<i>Masdevallia rosea</i>	<i>Masdevallia decumana</i>	AF262795	384/385 (99%)
8MC	<i>Masdevallia setacea</i>	<i>Masdevallia amabilis</i>	DQ923793	486/487 (99%)
9MC	<i>Masdevallia strobilii</i>	<i>Masdevallia strobilii</i>	DQ923776	365/367 (99%)
10MC	<i>Masdevallia xanthina</i>	<i>Masdevallia decumana</i>	AF262795	535/536 (99%)
11MC	<i>Pleurothallis niveoglobula</i>			
12MC	<i>Stelis concinna</i>	<i>Stelis argentata</i>	AF262872	552/554 (99%)
13MC	<i>Stelis hallii</i>	<i>Stelis argentata</i>	AF262872	655/660 (99%)
14MC	<i>Stelis superbiens</i>	<i>Stelis argentata</i>	AF262872	635/637 (99%)
15MC	<i>Stelis sp</i>			
16MC	<i>Epidendrum falcisepalum</i>			
17MC	<i>Epidendrum madsenii</i>			
18MC	<i>Epidendrum rhopalosteles</i>			
19MC	<i>Epidendrum sp</i>			
20MC	<i>Epidendrum rhopalosteles</i>	<i>Epidendrum medusae</i>	EF079382	572/595 (96%)
21MC	<i>Maxillaria confusa</i>			
22MC	<i>Nanodes medusae</i>			

Para la región matK la base de datos del GenBank no tiene secuencias de las especies estudiadas con excepción de una especie (*Nanodes medusae*), y tiene una cantidad poco considerable de secuencias del género *Dracula*. Obteniendo como resultado que las especies de este trabajo están dentro de sus respectivos géneros, con excepción de *Nanodes medusae* que corresponde a su género y especie. Mientras que los resultados de las especies del género *Dracula* se ubicaron cerca al género *Masdevallia*.

Tabla 5. Secuencias con mayor similitud en la **región matK** a las Orquideas secuenciadas obtenidas de la búsqueda en el GenBank utilizado Blast.

Código	Nombre morfológico	Busqueda en Blast	Número accesión al GenBank	Similitud
1MC	<i>Dracula dalessandroi</i>	<i>Dracula chimaera</i>	AF265444	686/690 (99%)
2MC	<i>Dracula mopsus</i>	<i>Masdevallia pinocchio</i>	AF265445	493/500 (98%)
3MC	<i>Dracula simia</i>	<i>Masdevallia pinocchio</i>	AF265445	588/592 (99%)
4MC	<i>Masdevallia citrinella</i>			
5MC	<i>Masdevallia guttulata</i>			
6MC	<i>Masdevallia nidifica</i>			
7MC	<i>Masdevallia rosea</i>	<i>Masdevallia uniflora</i>	AF265448	20/524 (99%)
8MC	<i>Masdevallia setacea</i>	<i>Masdevallia uniflora</i>	AF265448	605/606 (99%)
9MC	<i>Masdevallia strobilii</i>	<i>Masdevallia uniflora</i>	AF265448	575/580 (99%)
10MC	<i>Masdevallia xanthina</i>	<i>Masdevallia uniflora</i>	AF265448	575/580 (99%)
11MC	<i>Pleurothallis niveoglobula</i>	<i>Pleurothallis cardiantha</i>	AF285482	719/745 (96%)
12MC	<i>Stelis concinna</i>			
13MC	<i>Stelis hallii</i>			
14MC	<i>Stelis superbiens</i>	<i>Stelis argentata</i>	AF265464	522/528 (98%)
15MC	<i>Stelis sp</i>			
16MC	<i>Epidendrum falcisepalum</i>	<i>Epidendrum medusae</i>	EF079313	648/656 (98%)
17MC	<i>Epidendrum madsenii</i>	<i>Amblostoma cernuum</i>	AF263775	708/715 (99%)
18MC	<i>Epidendrum rhopalostele</i>			
19MC	<i>Epidendrum sp</i>	<i>Amblostoma cernuum</i>	AF263775	725/728 (99%)
20MC	<i>Epidendrum rhopalostele</i>			
21MC	<i>Maxillaria confusa</i>			
22MC	<i>Nanodes medusae</i>	<i>Epidendrum medusae</i>	EF079313	427/427(100%)

La base de datos de Gen Bank para la trnL-F también carece de nombres de las especies estudiadas. Identificando a nuestras secuencias dentro del género correspondiente y cercano a especies diferentes. Para el individuo de *Stelis* sp. sin identificar morfológicamente, se localiza próxima al género *Condylogo*.

Tabla 6. Secuencias con mayor similitud en la **región trnL-F** a las Orquideas secuenciadas obtenidas de la búsqueda en el GenBank utilizado Blast.

Código	Nombre morfológico	Busqueda en Blast	Número accesión al GenBank	Similitud
1MC	<i>Dracula dalessandroi</i>	<i>Dracula chinaera</i>	AF265489	687/690 (99%)
2MC	<i>Dracula mopsus</i>			
3MC	<i>Dracula simia</i>			
4MC	<i>Masdevallia citrinella</i>	<i>Masdevallia floribunda</i>	AF266966	585/654 (89%)
5MC	<i>Masdevallia guttulata</i>			
6MC	<i>Masdevallia nidifica</i>			
7MC	<i>Masdevallia rosea</i>	<i>Masdevallia pinocchio</i>	AF293433	1055/1147 (91%)
8MC	<i>Masdevallia setacea</i>			
9MC	<i>Masdevallia strobilii</i>	<i>Masdevallia floribunda</i>	AF266966	952/1031 (92%)
10MC	<i>Masdevallia xanthina</i>	<i>Masdevallia pinocchio</i>		670/721 (92%)
11MC	<i>Pleurothallis niveoglobula</i>	<i>Pleurothallis ruscifolia</i>	AF265500	
12MC	<i>Stelis concinna</i>	<i>Stelis argentata</i>	AF265513	685/696 (98%)
13MC	<i>Stelis hallii</i>	<i>Stelis argentata</i>	AF265513	578/587 (98%)
14MC	<i>Stelis superbiens</i>			
15MC	<i>Stelis sp</i>	<i>Condytago rodrigoii</i>	AF265516	970/999 (97%)
16MC	<i>Epidendrum falcisepalum</i>	<i>Epidendrum campestre</i>	AF297002	901/909 (99%)
17MC	<i>Epidendrum madsenii</i>	<i>Epidendrum campestre</i>	AF297002	660/667 (98%)
18MC	<i>Epidendrum rhopalosteles</i>	<i>Epidendrum campestre</i>	AF297002	891/902 (98%)
19MC	<i>Epidendrum sp</i>	<i>Epidendrum campestre</i>	AF297002	891/902 (98%)
20MC	<i>Epidendrum rhopalosteles</i>	<i>Epidendrum campestre</i>	AF297002	891/902 (98%)
21MC	<i>Maxillaria confusa</i>	<i>Maxillaria lindleyana</i>	EU099756	656/673 (97%)
22MC	<i>Nanodes medusae</i>	<i>Epidendrum campestre</i>	AF297002	884/901 (98%)

Los árboles filogenéticos se los realizó con las subtribus señaladas en la tabla 2. y se escogió, como grupo externo (out group) a especies de la tribu Neottieae de las LOWER EPIDENDRUM.

Se realizaron tres árboles uno para cada región: ITS, matK, trnL-F. Y se colocaron las tres subtribus Pleurothallidinae, Laeliinae, Maxillariinae dentro de cada árbol.

ITS.

En la región ITS se hicieron exclusiones en espaciadores intergenicos ITS1 e ITS2, no se hizo exclusiones en la subunidad 5.8S que es una región conservada. El árbol no

comprende la Subtribu Maxillariinae por falta de la secuencia de la muestra de *Maxillaria confusa*. A nivel de Subtribu se observa que están claramente separadas. La Subtribu Pleurothallidinae (A1-fig.C1.C2) no permite establecer una buena discrepancia a nivel de especies y género en *Draculas* y *Masdevallias*. Entre *Stelis* hay baja variabilidad, y se involucran dentro de *Pleurothallis*. Para la Subtribu Laeliinae (A1-Fig.C.3) también hay una variabilidad mínima entre especies.

matK.

Para el árbol con la región parcial del gen *matK* se realizaron exclusiones de zonas no conservadas. El árbol comprende las Subtribus Pleurothallidinae, Laeliinae pero no Maxillariinae por la falta de secuencia de la muestra de *Maxillaria confusa*. El árbol muestra la división de las dos Subtribus con una corta separación (A1-fig.A1.A2.A3). La Subtribu Pleurothallidinae (A1-Fig.A1) que comprende en este estudio al género *Dracula* con especies *D. mopsus*, *D. simia*, *D. dalesandroi*. Género *Masdevallia* que comprende *M. citrinella*, *M. setacea*, *M. xanthina*, *M. rosea*. Género *Pleurothallis* especie *P. niveoglobula* que presenta diferencia de distancia entre las especies, con una excepción en *Masdevallia strobilii* caracterizada morfológicamente presenta igual distancia que *Masdevallia uniflora* del GenBank. En cuanto a las *Masdevallias* se relacionan con *Draculas* y *Porroglossus*. Las *Stelis* están en el mismo clado que algunas *Pleurothallis* del GenBank, la *Pleurothallis niveoglobula* se encuentra en un clado de *Pleurothallis*.

La Subtribu Laeliinae (A1-fig.A1) representada en este trabajo por el género *Epidendrum* con las especies *E. falcisepalum*, *E. madsenii*, *E. rhopalosteale* *E. sp.* presentan diferencias entre las especies. *Epidendrum sp.* que morfológicamente tiene similitud con *Epidendrum rhopalosteale* está en el clado relativamente relacionado con *Epidendrum madsenii*. En cuanto a *Nanodes medusae* que fue separada de las *Epidendrum* y actualmente pertenece a la Subtribu Epidendrinae, en el árbol sigue relacionada con las *Epidendrum* y se identifica molecularmente como *Epidendrum*

medusae actualmente fue cambiada su denominación por *Nanodes medusae*.

trnL-F.

El árbol de la región *trnL-F* se realizaron exclusiones de las regiones muy variables como es el intron *trnL* que presenta grandes gaps, y las partes centrales del espaciador intergénético, tomando las partes más conservadas informativas para el árbol.

Este árbol representado por las tres Subtribus la Pleurothallidinae (A1- Fig B1) (árbol de la región *trnL-F*) con los géneros *Stelis* (*S. sp.*, *S. hallii*, *S. concinna*) se relacionan con las *Pleurothallis* pero presentando diferencia a nivel de especies, a diferencia de las *Stelis* sp. que se identifica como *Stelis argentata*. El género *Pleurothallis* (*P. niveoglobula*) con las demás *Pleurothallis* no presenta similaridad. En el género *Masdevallia* (*M. rosea*, *M. xanthina*, *M. citrinella*, *M. strobilii*) hay igualdad entre las especie posiblemente por la falta de una zona informativa de las *Masdevallia* debido a posibles exclusiones que se realizaron en la región. Las *Draculas* (*D. dalesandroi*) muestran diferencias entre especies y están abarcadas dentro del clado de las *Masdevallias*.

La Subtribu Laeliinae (A1-fig.B2) (árbol de la región *trnL-F*) con la Pleurothallidiane tienen un nivel bajo de separación. El género *Epidendrum* (*E. falcisepalum*, *E. sp.*, *E. rhopalostele*, *E. madsenii*) no está relacionado entre sí; presentando gran diferencia entre las especies ubicándolas en clados diversos. *Epidendrum* sp. que morfológicamente tiene características similares pero no exactas a *Epidendrum rhopalostele* lo que nos podría indicar que pudiera ser una variante de esta especie o que necesitamos incluir una zona más informativa para poder descartar esta hipótesis.

La Subtribu Maxillariinae (A1-fig.B3) género *Maxillaria* (*M. confusa*) tiene un nivel alto de divergencia con las Subtribu Pleurothallidinae y Laeliinae.

La situación de varias secuencias de orquídeas de este trabajo al ser comparadas con secuencias del GenBank no se identifican en genero o especie, esto pudiese aclararse si existiesen más secuencias disponibles de estas especies en el Genbank, y otra alternativa sería incluir más individuos de la misma especies para cada grupo seleccionado, lo que permitiría una comparación mas confiable.

No se las pudo unir en un árbol multigenes todas las regiones secuenciadas por no tener las secuencias de las tres regiones para todas las especies de orquídeas estudiadas, siendo importante para el barcoding tener mas cantidad de caracteres informativos para la diferencia a nivel de especies y para mejorar los árboles a nivel de taxos. Pridgeon (2001) atribuye además que la combinación de estas regiones mejora el nivel de los bootstrap para obtener un árbol con caracteres similares a los morfológicos.

IV. DISCUSIONES

Entre las perspectivas del trabajo está secuenciar orquídeas para su identificación rápida, a través de la comparación entre especies, esto ayudaría a la identificación de especies de orquídeas que no se puedan clasificar morfológicamente por ausencia de floración. Y que a futuro la técnica de barcoding pueda ser utilizada para mejorar los datos de las especies de orquídeas del Ecuador y posiblemente pueda usarse como una herramienta para el control de tráfico de especies.

Las secuencias de DNA obtenidas para cada especie estudiada permiten su identificación.

Para análisis forense usando DNA barcoding; la región ideal debe ser bastante corta para amplificar ADN degradado y analizar secuencias en un solo paso. Una posibilidad es desarrollar el cebador para obtener porciones cortas de estos genes para producir un barcode de longitud apropiada (Chase *et al*, 2007). En este trabajo las secuencias obtenidas fueron menores a los productos amplificados que pudo deberse a diferentes factores entre ellos el DNA degradado que no permite una buena amplificación de regiones grandes como son la región matK (1200pb), trnL-F(1200 pb) e ITS (1400pb) obstaculizando en parte una identificación de las especies.

Sin embargo las secuencias obtenidas de las dos *E. rhopalostele* y *Epidendrum sp.* que morfológicamente tiene características similares a *E. rhopalostele*, en el análisis filogenético de la región trnL-F la *E. sp* es igual que las dos *E. rhopalostele*. En la región matK la *Nanodes medusae* del Gen Bank es igual a la secuencia de la *Nanodes medusae* obtenida en el estudio. Permitiendo una identificación entre especies.

Hay dificultad para establecer un protocolo de DNA barcoding.

En la actualidad no hay ningún protocolo estándar para DNA barcoding en plantas terrestres. Esto es principalmente porque la región de ADN mitocondria gen *cox1* usado como barcode

oficial para los animales no tiene un buen nivel de variabilidad en el ADN de plantas (Chase *et al*, 2007). Sin embargo se han tomado atributos de algunas regiones de plastidos: como la combinación de genes, *rpoC1*, *rpoB* and *matK*, y otra combinación de *rpoC1* and *matK*, y un espaciador intergénico *psbA-trnH* <http://www.rbgekew.org.uk/barcoding/udatehtml> que están siendo discutidas por la dificultad y costo que abarca tener un análisis completo de las tres regiones para cada individuo (Chase *et al*, 2007). En este estudio se trabajo con tres regiones dos de plastidos *matK*, *trnL-F* y una nuclear sin poder obtener las tres secuencias para cada individuo siendo esto un limitante para realizar una identificación rápida.

Que región posibilita establecer diferenciación interespecífica.

Para barcode se necesita una región conveniente que debe mostrar bastante variación con suerte dentro de la diferencia entre las especies, Chase *et al* (2007) mencionan que la región *matK* muestra en muchos estudios de plantas niveles altos de variación para una buena discriminación de especie en plantas. En este estudio entre las tres regiones *matK*, *trnL-F* e ITS, la región parcial 5' de *matK* es una de las que presenta mejor diferencia a nivel de especie. Hilu *et al* (1997) explica que la región 5' tendría que usarse con prevención en los estudios sistemáticos a niveles taxonómicos altos debido a sitios saturados, además de que varias secciones del gen del *matK* muestran que tiene que ser examinado en su integridad para evaluar el uso potencial de sus diferentes partes dependiendo de las preguntas evolutivas particulares.

La región no codificada del exón de *trnL* (UAA) y *trnF* (GAA) está usándose cada vez más a nivel de especies para la reconstrucción filogenética, entendiéndose como un bueno modelo de substitución deseable (Borsch *et al*, 2003). El intrón de *trnL* también se ha sugerido como una región apropiada para el ADN barcoding (Taberlet *et al*, 2007). Sin embargo la resolución de esta región es demasiado alejada y baja debido a su lenta evolución (Shaw *et al*, 2005). Para ser una región

no-codificadora, se conserva sorprendentemente, quizás debido a su estructura secundaria favorablemente conservada (Chase *et al*, 2007). En este trabajo la región trnL-F no permitió una divergencia entre las especies del género *Masdevallia*. Pridgeon (2007) menciona que trnL-F presenta el mismo nivel de variabilidad de matK. Sin embargo en este estudio trnL-F presenta buena variabilidad igual que matK, para el género *Masdevallia* probablemente no hay diferencia a nivel de especies por exclusiones de la zona informativa del género. Sin embargo la región trnL-F en *E. rhopalostele* permite su identificación pues en el estudio se incluyeron dos individuos de la misma especie como comparación.

Otra región ampliamente en uso y más inconstante que se ha propuesto como una región del barcoding es la Subunidad Interna Transcrita del DNA nuclear ribosomal o nrITS (Chase *et al*, 2005; Kress *et al*, 2005). Los ITS tienen un registro largo de uso (Douzery *et al*, 1999), y en la mayoría de los grupos de plantas en floración han sido un buen marcador filogenético. Van Den Berg *et al*, (2000) comenta que en casi todos los casos, han producido los resultados similar a aquéllos encontrados con el ADN de plastidos, pero tiene a menudo 3–4 veces sitios más inconstantes que han evolucionado cuatro veces más rápido (Van Den Berg *et al*, 2000). El ITS nuclear también está sujeto en la mayoría de los organismos a la evolución del gen de conservación adecuada para que un solo tipo de la copia se mantenga (la variación entre los miles de copias ocurre, pero una copia de acuerdo general predomina). Sin embargo, en algunas plantas de tierra, se mantienen las copias múltiples, e incluso en algunos grupos de angiospermas varias copias funcionales divergentes e inmóviles de ITS se descubre rutinariamente (Rapini *et al*, 2006). Pero los problemas relacionados a su evolución molecular en muchos grupos hacen indeseable incluir la región ITS en la propuesta para un protocolo estandarizado para todas las plantas de tierra como en Orquídeas aunque en algunos taxones es posible secuenciar directamente ITS sin encontrar problemas asociados a la paralogía (Salazar *et al*. 2003) en otros taxones es evidente que existen copias paralogas de ITS. (Salazar *et al*, 2007) El resultado de este

estudio permitió una diferencia clara entre subtribus pero a nivel de especies las tasas son muy similares con distancia poco diferenciales. Entre las regiones matK, trnL-F e ITS, fue la región ITS en las Pleurothallidinae la que presentó mayor nivel de divergencia en el estudio de Pridgeon *et al.* (2001). En la subtribu Laeliinae la región ITS hizo una valiosa contribución a nivel de tasas (Van den Berg *et al.* 2000). El resultado de este estudio puede deberse a que las secuencias obtenidas fueron cortas abarcado en su mayoría la subunidad 5.8S que es una zona muy conservada y por lo tanto se tiene menos caracteres informativos, recomendando que las secuencias obtenidas deben ser más amplias para obtener mejor información de las partes variables como son ITS1 e ITS2. O también estos resultados pueden deberse a paralogías presentes en la orquídeas como comenta Salazar *et al.* (2007).

Los árboles filogenéticos de las tres regiones matK, trnL-F e ITS presentaron una vinculación entre los géneros *Dracula*, *Masdevallia* y *Stelis*, *Pleurothallis* al igual que el trabajo de Pridgeon *et al.* (2001) con estas regiones que muestran una divergencia mínima entre estos géneros. Cameron (2007) realizó un estudio a partir de datos de Pridgeon (2001) para observar la hibridación entre *Masdevallias* y *Dráculas*, concluye que algunas especies de *Dráculas* son parafiléticas.

La especie *Nanodes medusea* que era considerada *Epidendrum* (Subtribu Laeliinae), actualmente pertenece a la subtribu Epidendrinae por Szlachetko 1995. Esta especie en este estudio está muy relacionada con las *Epidendrum* (Subtribu Laeliinae) tanto en ITS, matK, trnL-F, al igual que presenta KulaK (2006) en el estudio con la región matK, que la subtribu Epidendrinae está dentro de la subtribu Laeliinae. Sugiriendo un estudio más detallado de este género para efectivamente separarlos de las *Epidendrum*.

Esta investigación fue un trabajo preliminar para establecer los protocolos de DNA barcoding que permitan la identificación de muchas muestra de orquídeas involucradas en estudios diversos de ecología y conservación de orquídeas que resulta muy difícil su identificación por la ausencia de floración. Se

continuará con regiones que involucren la región matK además de otras regiones.

V. CONCLUSIONES

La cantidad de DNA obtenida de las hojas de orquídeas fue la adecuada para la amplificación de las tres regiones.

Las condiciones establecidas para la PCR de las tres regiones permitieron obtener buenos productos de DNA para la secuenciación.

Las secuencias obtenidas de las orquídeas ayudaron a corroborar la identificación morfológica de las mismas.

En el análisis filogenético de la región matK es la que presenta mayor variabilidad interespecie, siendo la más adecuada para DNA barcoding.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Bakker F, Culham A, Gomez R, Carvalho J, Compton J, Dawtrey R, Gibby M, 2000. Patterns of Nucleotide Substitution in Angiosperm cpDNA trnL (UAA)–trnF (GAA) Regions. 1147. 1-2.
- Barthet M, Hilu K, 2007. Expression of matk: Functional and Evolutionary Implications. American Journal of Botany 94: 1402–1404.
- Balwin, B, G., M. J. Sanderson, J.M. Porter, M. F. Woiciechowski, C, S, Campbell, y M. J Donoghues. 1995. The ITS region nuclear region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm. phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden 82: 247-277.
- Bateman, R. M, A. M. Pridgeon and M.W. Cjase.1997. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) Based on nuclear ITS sequence. 2. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis* sensu stricto. Lindleyana 12: 113-141.
- Borsch T, Hilu K. W., Quandt D. Wilde V. Neinhuis, y Barthlott W. 2003. Noncoding plastid trnT-trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. J. Evol. Biol. 16: 558-576
- Cameron K. M. , Chase M. W., Whitten W. M., Kores P. J., Jarrell D. C., Albert V. A., Yukamwa T. Hills H. G., y Goldman D. H., 1999. A phylogenetic analysis the Orchidaceae: Wviden

- Cameron K, Meyer G, 2007. Molecular Systematics and DNA barcoding of *Dracula* Species (Pleurothallidinae; Epidendroideae; Orchidaceae). Second Scientific Conference on Andean Orchids. 11.
- Chase M, Salamin, N, Wilkinson M, Dunwell, J, Kesanakurthi R, Haider, N, Savolainen V, 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos. Trans., Ser. B* 360: 1889–1895.
- Chase M, Cowan R, Hollingsworth P, van den Berg C, Madriñán S, Petersen G, Seberg O, Jørgensen T, Cameron K, Carine M, Pedersen N, Hedderson T, Conrad F, Salazar G, Richardson J, Hollingsworth M, Barraclough T, Kelly L, Wilkinson M, 2007. A Proposal For A Standardised Protocol To Barcode All Land Plants. 56. 295–299
- Dressler R, 1982. Dressler, Robert L. The Orchids: Natural History and Classification. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1990. Public QK495 .O64 D74 1990.
- Dirk U, Bellstedt H, Linder P, Harley E, 2001. Phylogenetic Relationships in *Disa* Based on Non-Coding trnL - trnF Chloroplast Sequences: Evidence of Numerous Repeat Regions. *American Journal of Botany* 88: 2096–2097.
- Douzery E, Pridgeon A, Kores P, Linder P, Kurzweil H, Chase M, 1999. Molecular Phylogenetics of *Disa* (Orchidaceae): A Contribution from Nuclear Ribosomal ITS Sequences. *American Journal of Botany* 86: 887–888.
- Dodson C, 2001. Native Ecuadorian Orchids, vol I. pp. 20

- Dodson C, 2002. Native Ecuadorian Orchids, vol III. pp. 435
- Dodson C, 2005. Native Ecuadorian Orchids, vol IV. pp. 665
- Endara L, León S, 2007. Patrones de Endemismo de la Flora Endémica de Orquídeas Ecuatorianas. Second Scientific Conference an Andean Orchids. pp. 34.
- Gravendeel B, Chase M, Vogel E, Roos M, Mes T, Bachmann, 2001. Molecular Phylogeny of Coelogyne (Epidendroideae; Orchidaceae) Based on Plastid RFLPS, matk, and Nuclear Ribosomal ITS secuencias: Evidence for Polyphyly. American Journal Of Botany 88: 1916.
- Hapeman, J. R., y K. Ingue.1997. Plant Pollinator interactions and floral radiation in *Platanthera* (Orchidaceae) in T. J. Givnish y K. J. Sytsma (eds). Molecular evolution and adaptive radiation, 433-454. Cambridge University press, Cambridge.
- Hebert, P, Cywinska A, Ball S, Waard J, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci. 270: 313–321.
- Hebert P, Ratnasingham S, Waard J, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related animals. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci.* 270: 96–99
- Hebert P, Gregory T, 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology* 54: 852-859.

- Hershkovitz M. A., Lewis L. A., 1996. Deep level diagnostic values of the rDNA- ITS region. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1276-1295.
- Hilu K, Liang H, 1997. The *Matk* Gene: Sequence Variation and Application in Plant Systematics. *American Journal of Botany* 84: 830–839.
- Hilu K, Borsch T, MullerK, Soltis D, Soltis P, Savolainen V, Chase M, Powell M, Alice L, Evans R, Sauquet H, Neinhuis C, Slotta T, Rohwer J, Campbell C, Chatrou L, 2003. Angiosperm Phylogeny Based on *matK* Sequence Information1 *American Journal of Botany* 90: 1758–1759.
- Hirtz A, 2004. *Tierra Incógnita*, vol. 32.
- Luer C. A., 1986. *Icones Pleurothallidarum XI: Systematics of the Pleurothallidinae*. Missouri Botanical Garden Press Sarasota Florida. pp 81
- Kress W, Wurdack K. Zimmer A , Weigt L, Janzen D 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 8369–8374.
- Lacey MR, Chang JT. A signal-to-noise analysis of phylogeny estimation by Neighbor-Joining: Insufficiency of polynomial length sequences. *Mathematical Biosciences* 2006; 199(2): 188-215.
- Posada D and Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.
- Pridgeon, A M. Bateman R. M. Cox A. V. Hapeman J. R. y Chase M. W. 1999. Phylogenetic subtribu Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) Based on nuclear ITS

sequences.1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis sensu lato* Lindleyana 12: 89-109.

- Pridgeon A, Solano R, Chose M, 2001. Phylogenetic Relationship in Pleurotallidinae (Orchidaceae) Combined Evidence from Nuclear and Plasmid DNA sequence. American Journal of Botany 88: 2286-2308.
- Pridgeon A, 2007. A History of Orchid Classification. Second Scientific Conference an Andean Orchids. Pp 8.
- Pupulin F, 2007. A Chondrorhyncha by Other (Correct) Name. Second Scientific Conference an Andean Orchids. pp 16.
- Ratnasingham S, Hebert P, 2007. The Barcode of Life Data System. Molecular Ecology. Notes doi: 10.1111/j.147-8286.2006.01678.
- Rapini, A., Chase, M. W., Konno, T. U. P. 2006. Phylogenetics of the New World Asclepiadeae (Apocynaceae). Taxon 55: 119-124.
- Salazar G, 2007a. DNA, Morphology, and Phylogeny in the Classification of the Spiranthoid Orchids. Second Scientific Conference an Andean Orchids. 10.
- Salazar G. 2007b. Código de Barra Genético de Cinco Grupos Críticos de la Flora de México. Unpubl: 3-6, 11-12.
- Shaw J., Leckey E. B., Schilling E. E., y Small R. L., 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studied in Angiosperms: The tortoise and the hare III. American Journal of Botany 94 (3): 275-288.

- Szlachetko D, 1995. *Systema Orchidaliium*. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Science. pp.75, 76, 94.
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C, Valentini A, Vermat T, Corthier G, Willerslev E, 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acid. Res.* 35: 14.
- Van den Berg C, Higgins W, Dressler. L, Whitten W, Soto M, Culham A, Chase M, 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from nuclear internal transcribed spacers (ITS) of ribosomal DNA. *Lindleyana* 15: 96114.
- Van den Berg C, Luz P, Chase M, 2007. Phylogenetics of Laeliinae with Emphasis in the *Catleya* Alliance. Second Scientific Conference an Andean Orchid. pp 14
- Valencia R., Pitman N., León-Yáñez & P.M. Jorgensen (eds), 2000. Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador. Herbario Q.C.H, Ponifica Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Whitten W, Blanco M, Norris W, Koehler S, Carnevali G, Singer R, Endara L, Neubig K, 2007. Phylogeny and Generis Recircumcriptions in *Maxillaria* and Relates Genera (Orchidacee: Maxillariinae). Second Scientific Conference Andean Orchids. pp13.

ANEXOS

Fig. A2

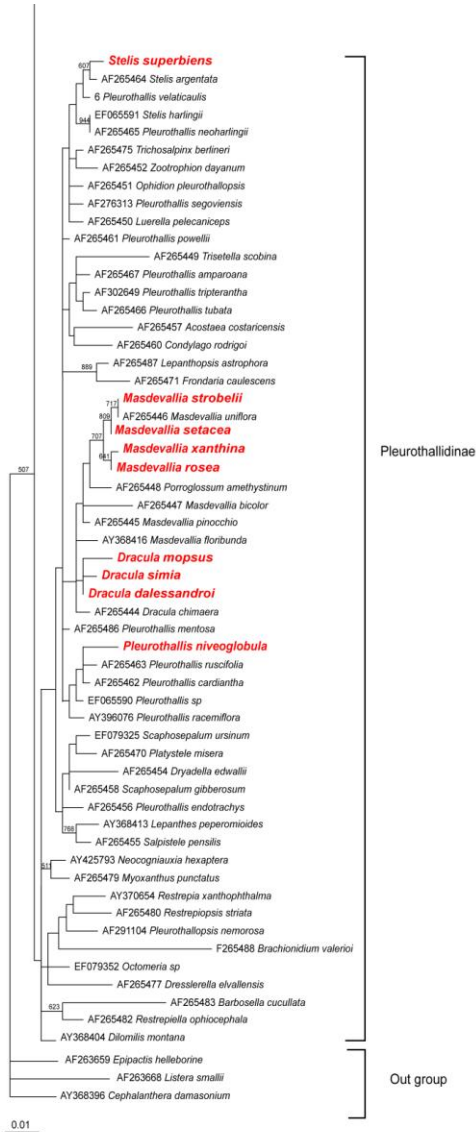


Fig. B1
trnL- F

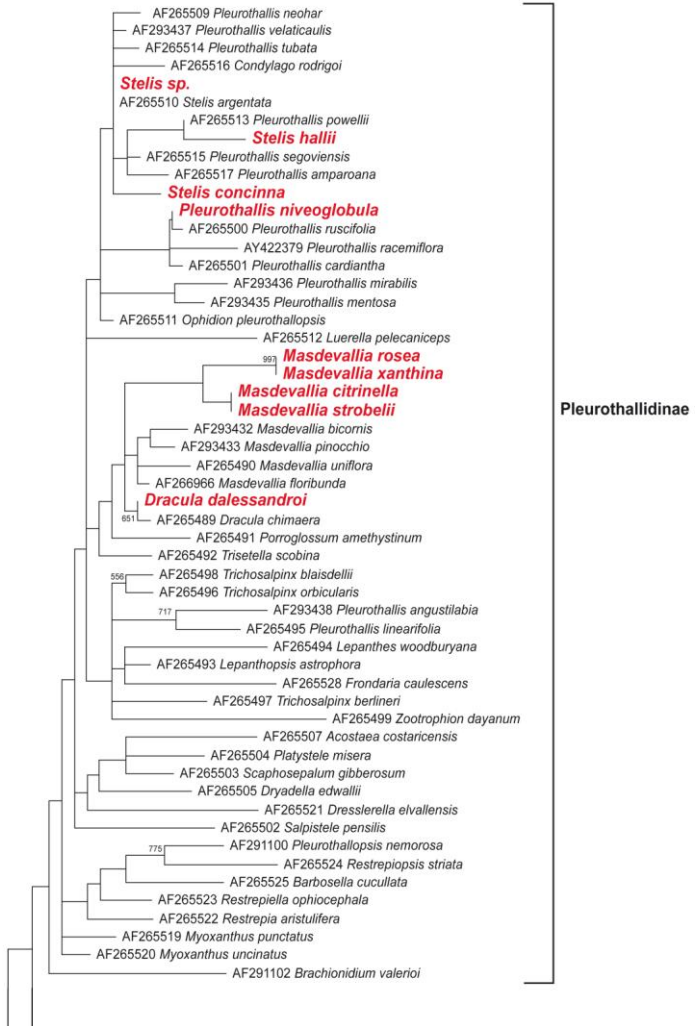


Fig. B2

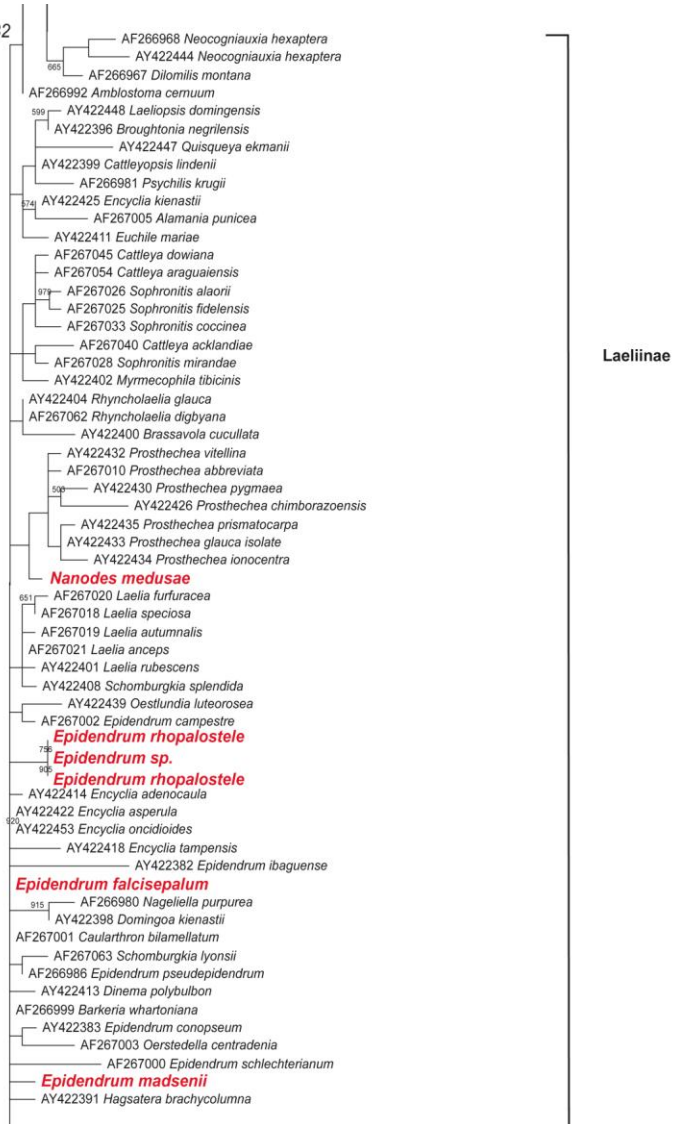


Fig. B3

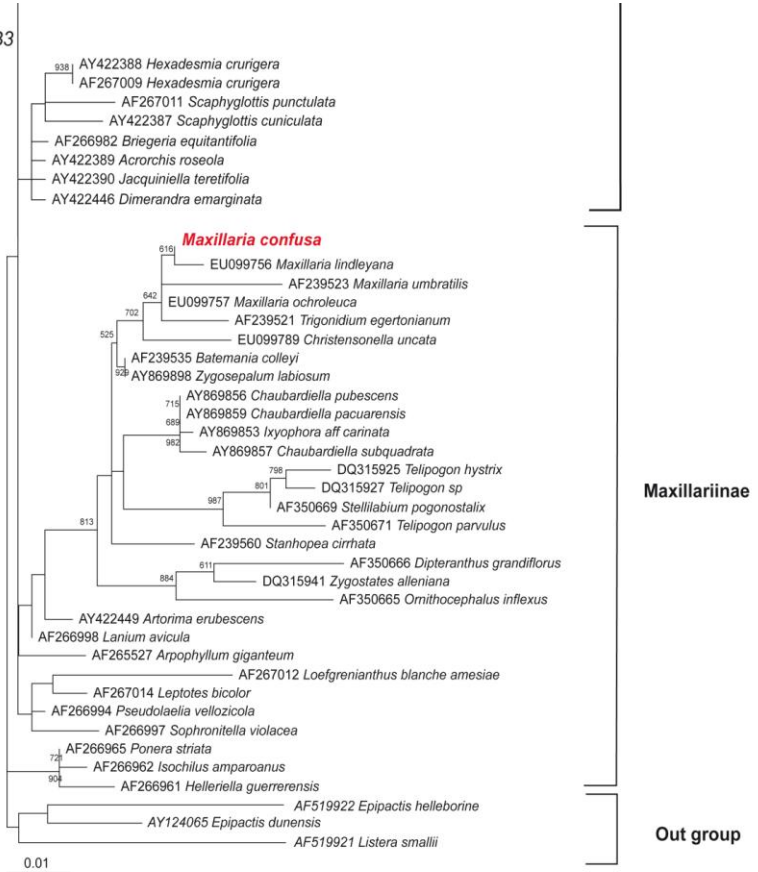


Fig. C1

ITS



Pleurothallidinae

Fig. C2

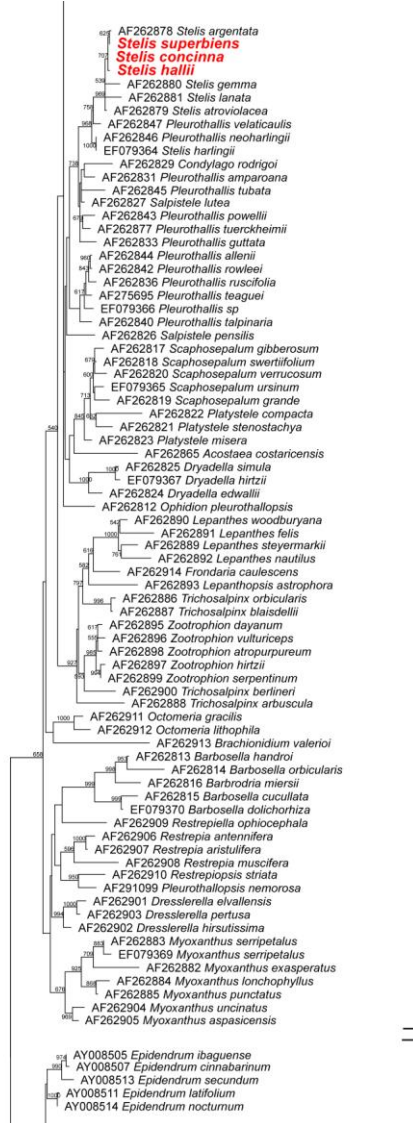


Fig. C3



0.1

A2. MORFOLOGÍA DE LAS ORQUIDEAS

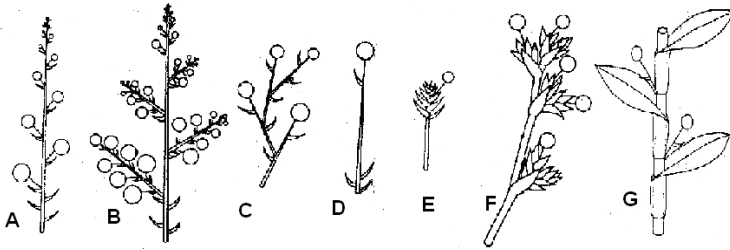


Fig.1. Inflorescencia: (A) racimo. (B) panícula (C) cymose o determinante inflorescencia como en *Lockhartia*. (D) Inflorescencia con única flor, terminal o axilar. (E) Inflorescencia condensada en la que las flores son producidas una por una. (F) La inflorescencia de *Sigmatostalix*, en que cada flor surge de un grupo de bracts. (G) Inflorescencia de hoja opuesta, como en *Dichaza*, cuando surge de la parte opuesta de la hoja.

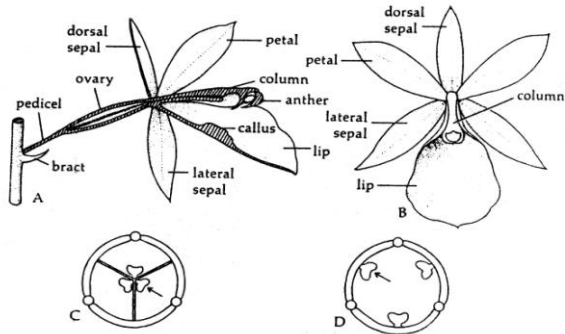


Fig.2. Partes de la flor (A) Sección longitudinal (B) Vista frontal de la flor. (C) Sección transversales de un período de tres ovarios lobulares, muestran la placentación. (D) De una sección cruzada de un ovario lobular.

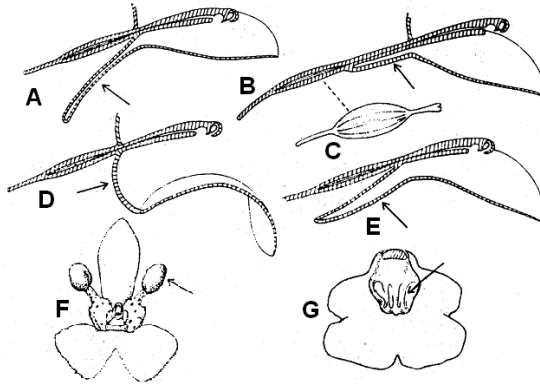


Fig.3. Varias estructuras florales. (A) Estolón formado por el labio. (B) Canaliculos. (C) Pico de frutas (el pico representando los canaliculos de una flor). (D) Pie de la columna. (E) Espolón formado por la columna y el pie labio. (F) *Pleurothallis raymondii*, musatran osmophores (G) Lip *Sigmatostalix picturatissima*, muestra elaiophore.

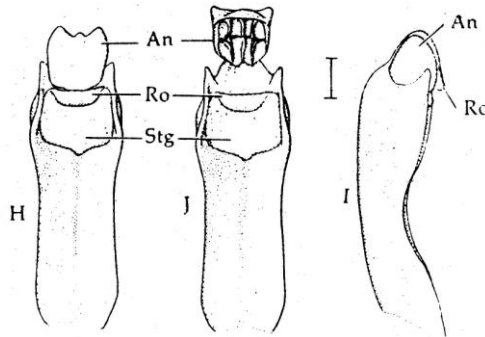


Fig.4. Columna. (H) A la izquierda una columna. (J) Vista frontal con la antera (An) levantada. (I), A la derecha vista lateral del disco con el rostellum (Ro) visible, el estigma (Stg).

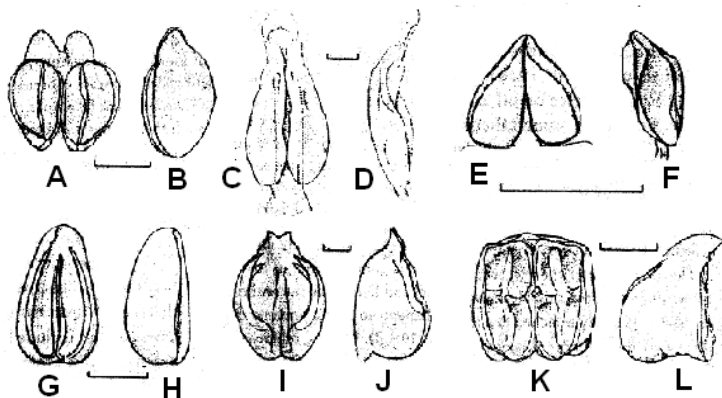


Fig.5. Anteras de varias orquídeas. En cada caso, ventral (clinandrial) y la vista lateral se muestran. (A, B) *Phragmipedium*. (C, D) *Sarcoglottis*. (E, F) *Prescottia*. (G, H) *Epipactis*. (I, J) *Sobralia*. (K, L) *Schomburgkia*. (M, N) *Cochleanthes*. (O, P) *Maxillaria*. Escala 1 mm

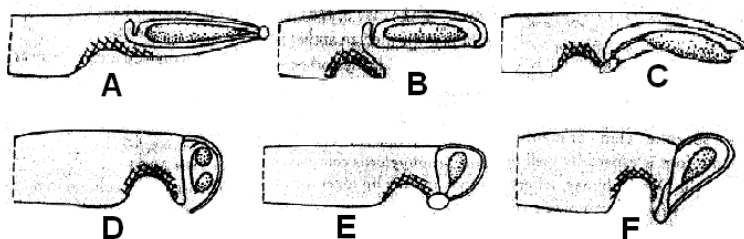


Fig.6. Diagrama muestra relación entre antera y estigma. Polen, granulado. El estigma, la cruz-rayada. (A) *Spiranthoideae*, con antera dorsal y rostelum subigual a antera. (B) *Neottieae*, antera terminal, proyectada más allá del rostelum. (C), *Orchidaceae*, con viscidium basal. (D) *Epidendroideae*, con anteras titulares. (E) *Vandoideae* o *Epidendroideae* avanzada, con viscidium. (F) *Vandoideae*, viscidium y estípite.

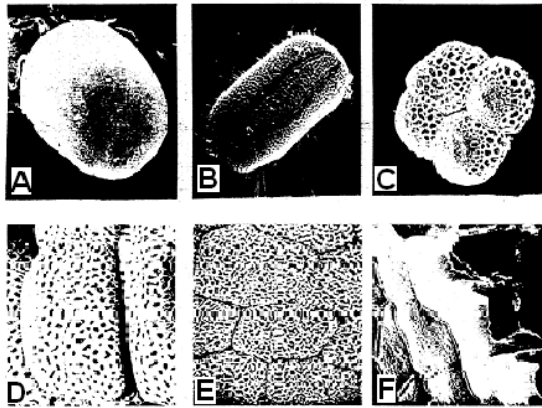


Fig.7. Estructura de polen de orquídeas. Fotografías en microscopio electrónico. (A) *Selenipedium chica* (Cypripedium). (B) *Neuwiedia veratrifolia* (Apostasioideae). (C) *Epipactis microphylla* (Neottieae). (D) *Ponthieva racemosa* (Cranuchideae). (H) *Abenaria repens* (Orchideae). (F) *Cochleanthes picta*. (Maxillarieae), El estriado muestra un espesor de exina en la superficie exterior del polinio, y la falta de espesor de exina en el polinio.



Fig.8. Polinias de una orquídea ancestral, que se parecen mucho a las flores de los estambres comunes. (B). Polinia con masa granular de polen. (C) Cuatro polinias interconectadas por células que se conectan al caulículo.

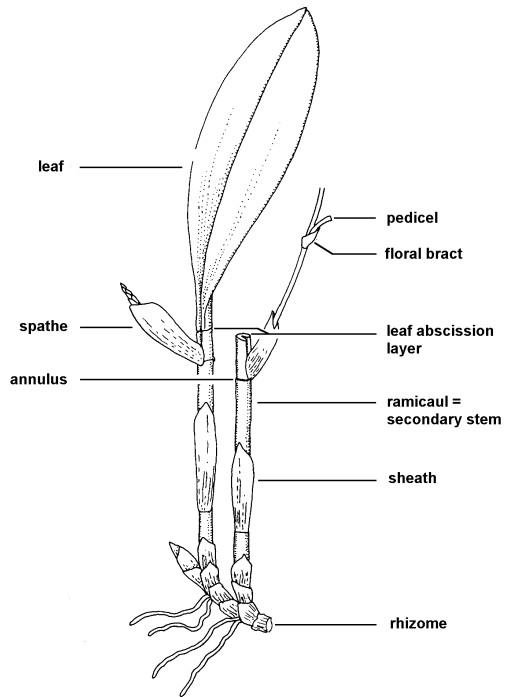


Fig.9. Morfología de la Subtribu Pleurothallidinae.

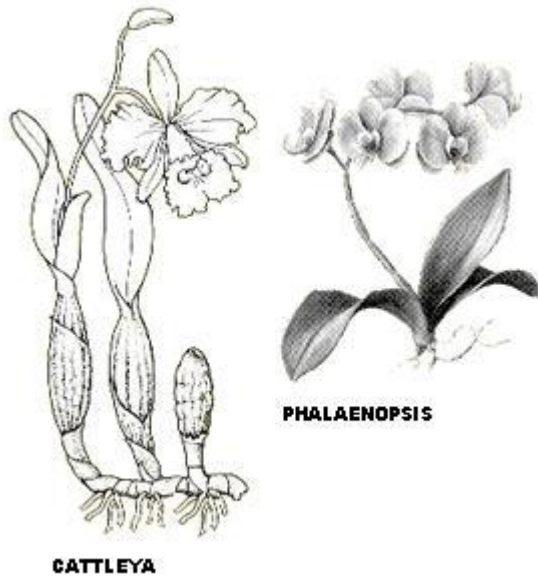


Fig.10. Morfología de la Subtribu Laeliinae.



Oncidium

Fig.11. Morfología de la Subtribu Maxillariinae

A4. FOTOS DE ORQUIDEAS



Dracula dalessandroi



Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Dracula</i>
Especie	<i>D. dalessandroi</i>

Modificación: Maritza Carrión



Dracula mopsus

Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Dracula</i>
Especie	<i>D. mopsus</i>



Modificación: Maritza Carrión



Dracula simia

Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Dracula</i>
Especie	<i>D. simia</i>



Modificación: Maritza Carrión



Masdevallia citrinella

Familia: Orchidaceae
Subfamilia: Epidendroideae
Tribu: Epidendreae
Subtribu: Pleurothallidinae
Género: *Masdevallia*
Especie: *M. citrinella*



Modificación: Maritza Carrión



Masdevallia guttulata

Familia: Orchidaceae
Subfamilia: Epidendroideae
Tribu: Epidendreae
Subtribu: Pleurothallidinae
Género: *Masdevallia*
Especie: *M. guttulata*



Modificación: Maritza Carrión



Masdevallia nidifica



Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Masdevallia</i>
Especie	<i>M. nidifica</i>

Modificación: Maritza Carrión



Masdevallia rosea

Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Masdevallia</i>
Especie	<i>M. rosea</i>



Modificación: Maritza Carrión



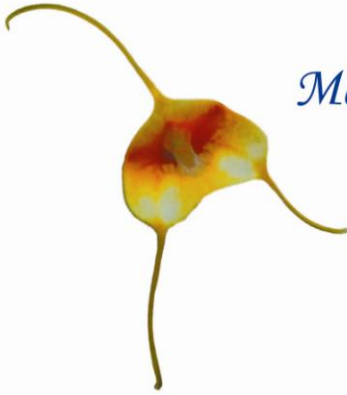
Masdevallia setacea

Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Masdevallia</i>
Especie	<i>M. setacea</i>



Modificación: Maritza Carrión

Masdevallia strobilii



Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Masdevallia</i>
Especie	<i>M. strobilii</i>



Modificación: Maritza Carrión



Masdevallia xanthina

Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Masdevallia</i>
Especie	<i>M. xanthina</i>



Modificación: Maritza Carrión



Pleurothallis niveoglobula



Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Eoidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Pleurothallis</i>
Especie	<i>P. niveoglobula</i>

Modificación: Maritza Carrión



Stelis concinna

Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Stelis</i>
Especie	<i>S. concinna</i>



Modificación: Maritza Carrión



Stelis hallii

Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Stelis</i>
Especie	<i>S. hallii</i>

Modificación: Maritza Carrión



Stelis superbiens



Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Stelis</i>
Especie	<i>S. superbiens</i>

Modificación: Maritza Carrión



Stelis sp.

Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Pleurothallidinae
Género	<i>Stelis</i>
Especie	<i>S. sp</i>



Modificación: Maritza Carrión



Epidendrum falcisepalum

Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Laeliinae
Género	<i>Epidendrum</i>
Especie	<i>E. falcisepalum</i>



Modificación: Maritza Carrión

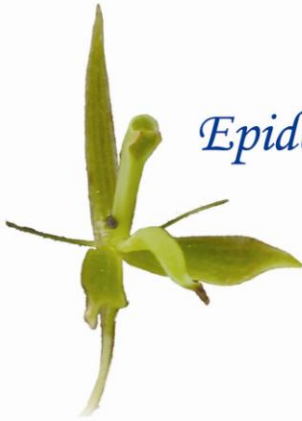


Epidendrum madsenii

Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Tribu	Epidendreae
Subtribu	Laeliinae
Género	<i>Epidendrum</i>
Especie	<i>E. madsenii</i>



Modificación: Maritza Carrión



Epidendrum rhopalosteles

Familia
Subfamilia
Tribu
Subtribu
Género
Especie

Orchidaceae
Epidendroideae
Epidendreae
Laeliinae
Epidendrum
E. rhopalosteles

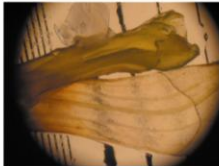


Modificación: Maritza Carrión



Epidendrum sp.

Familia Orchidaceae
Subfamilia Epidendroideae
Tribu Epidendreae
Subtribu Laeliinae
Género *Epidendrum*
Especie *E. sp*



Modificación: Maritza Carrión



Maxillaria confusa

Familia Orchidaceae
Subfamilia Epidendroideae
Tribu Maxillarieae
Subtribu Maxillariinae
Género *Maxillaria*
Especie *Max. confusa*



Modificación: Maritza Carrión



Nanodes medusae

Familia Orchidaceae
Subfamilia Epidendroideae
Tribu Epidendreae
Subtribu Epidendrinae
Género *Nanodes*
Especie *N. medusae*



Modificación: Maritza Carrión

A5. FOTOS DE ORQUÍDEAS SIN FLOR

SUBTRIBU PLEUROTHALLIDINAE

Draculas sin flor



D. dalessandroi



D. mopsus



D. simia



Masdevallias sin flor



M. citrinella



M. nidifica



M. setacea



M. strobilii



M. xanthina



M. rosea



M. gutulata



Stelis sin flor



S. conncinna

S. superbiens

S. hallii

S. sp

SUBTRIBU LAELIINAE

Epidendrum sin flor



E. falsicepalum

E. sp

E. rhopalostele

SUBTRIBU MAXILLARIDINAE

Maxillarias sin flor



**A6. PROTOCOLO DE EXTRACCION DE DNA PureLink™
Plant Total DNA Purification Kit (Promega).**

Lisis de las plantas

1. Para el tejido de la planta, congelar el tejido con nitrógeno líquido y macerar hasta obtener polvo.
Para el tejido blando y no fibroso, se corta el tejido en pedazos muy pequeños; para liofilizar la muestra.
2. Adicionar 200ul **Resuspensión buffer** (R2), provisto en el kit de tejido, este paso se lleva a cado a temperatura ambiente.
3. Preparar la lisis por homogenización del tejido con un homogenizante o por vortex.
4. Adicionar 15 ul, 20% SDS y 15 ul RNase a (20 mg/ml), provisto en el kit..
5. Incubar a 55°C por 15 minutos para completar la lisis.
6. Centrifugar a alta velocidad por 5 minutos, para remover el material insoluble.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo estéril de microcentrífuga de 1,5 ml; sin que exista disturbios en del pellet.
8. Adicionar 100ul **buffer precipitado** (N2), provisto en el kit y mezclar por vortex e incubar en hielo por 5 minutos.

9. Centrifugar a máxima velocidad en una microcentrífuga por 5 minutos a temperatura ambiente.

Nota: el sobrenadante debería ser limpio y no viscoso después de los pasos de precipitación.

10. Transferir 250ul de sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga estéril y adicionar 375ul **Binding Buffer** (B4) con etanol. Mezclar bien.
11. Procedimiento de **Binding DNA**.

Binding DNA

1. Adquirir un tubo de Purelink Spin Cartridge Coleccion desde el paquete.
2. Adicionar a cada muestra **Binding buffer**, desde el paso 10, previsto en la página de Purelink Spin Cartridge.
3. Centrifugar el cartridge a 12 500 x g por un tiempo de 30 segundos a temperatura ambiente.
4. Descartar el liquido y pasar al spin cartridge a un nuevo tubo, previsto en el kit.
5. Proceder al lavado del DNA.

Lavado del DNA

1. Adicionar 500 ul **Wash buffer** (W4, previsto en el kit).
2. Centrifugar el cartridge a 10 000 x g por un tiempo de 30 segundos a temperatura ambiente. Descartar el fluido y pasar la columna negra a otro tubo.
3. Adicionamos 500 ul **Wash buffer** (W5), con etanol en la columna.
4. Centrifugar el cartridge a 10000 x g por un tiempo de 30 segundos a temperatura ambiente. Descartar el fluido a través del tubo **wash** y pasar la columna negra en el tubo.
5. Repetir el paso 3 – 4 una vez más.
6. Centrifugar el cartridge a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambientes, remover algunos residuos de **wash buffer** (W5). Descartar el **wash tube**.
7. Proceder el **eluting DNA**.

Eluting DNA

1. Pasar el spin cartridge a un tubo estéril, libre de DNase free de 1,5 ml para microcentrifuga.
2. Adicionar 100 ul de **Elution buffer** (E1) y estéril, agua destilada (pH >7.0).
3. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar el cartridge a máxima velocidad por 1 minuto. *El tubo elution contiene el purificador de DNA.*
4. Para remover más DNA, intervenir un segundo paso de elution usando 100 ul **Elution buffer** (E1) o agua destilada. Tú podrías ihacer una segunda **elution** usando la muestra del tubo elution o un diferente tubo.
5. Centrifugar la columna a temperatura ambiente a máxima velocidad por 1 minuto.
El tubo de elution contiene el DNA purificado. Remover y descartar el cartridge.

A7. CONDICIONES PARA LA PCR

PROTOCOLO DE PCR- PROMEGA PCRn.

FECHA:
NOMBRE:

N/COD	Descripción	Dil.
A1		
A2		
A3		
A4		
A5		
A6		
A7		
A8		

N/COD	Descripción	Dil.
B1		
B2		
B3		
B4		
B5		
B6		
B7		
B8		

N/COD	Descripción	Dil.
C1		
C2		
C3		
C4		
C5		
C6		
C7		
C8		

	x 1	x	x 24	Con. final
Buffer (10X sin MgCl2) dd H2O	5 uL		120 uL	1 x
MgCl2 (25 mM)	32.6 uL		782.4 uL	
dNTPs (5 mM)	3 uL		72 uL	1.5 mM
Primer (25 pmol/uL)	2 uL		48 uL	0.2 mM
Primer (25 pmol/uL)	1 uL		24 uL	0.2 pmol/uL
Taq polimerasa (5U/uL)	1 uL		24 uL	
BSA 1%	0.2 uL		4.8 uL	
	45 uL			=Total

Electroforesis es gel de agarosa al 0,7% .
3 uL de (3uL. Prod PCR + 1 azul) 1.5 uL de marcador peso molecular.
Corrida de 70 minutos a 128V y 50 mA para cubetas pequeñas de electroforesis.
Luego se deja en la solución de bromuro de etidio (0.5 ug/mL) por 20 min y luego 15 de lavado en agua destilada.

=Total

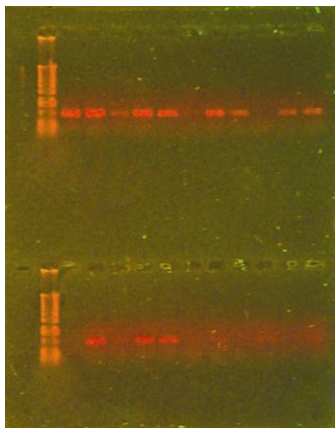
3 uL de DNA matriz por reacción

Programa Termociclador

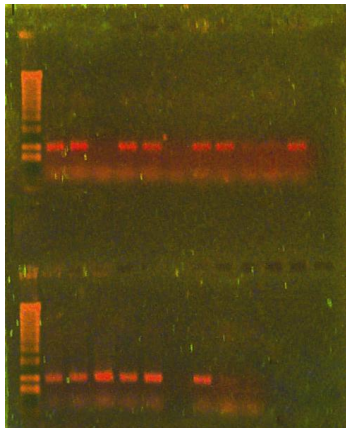
Desnaturalización inicial	94 °C	3:00 min
N. ciclos touch down		
Desnaturalización	94 °C	0:00 min
Anillamiento		0:45 min
Extension	72 °C	1:00 min
N. ciclos constantes		
Desnaturalización	94 °C	0:30 min
Anillamiento		0:45 min
Extension	72 °C	1:00 min
Extension final	72 °C	7:00 min

IPS 10 Dic 2004

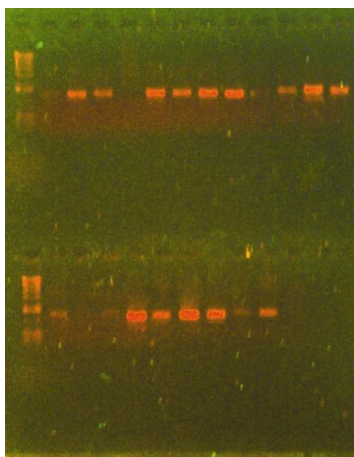
A8. FOTOS DE LOS PRODUCTOS DE PCR. (Observadas como bandas claras de las tres regiones en estudio *matK*, *trnL-F*, ITS).



Productos de PCR, de la región amplificada *matK*



Productos de PCR, de la región amplificada *trnL-F*.



Productos de PCR, de la región amplificada *ITS*.

A9. PROTOCOLO
PCR Purification Kit Protocol

NA: **QIAquick**

1. Agregar **5 volúmenes de buffer PB** a 1 vol. del producto de PCR (250 ul PB) y mezcle (vórtex). Esperar 5 min.
2. Colocar en una columna lila QIAquick con tubo de colección de 2 ml (proveído) y centrifugar **1 min a 13000 rpm**.
3. Descartar el sobrenadante y rehusar el tubo mas la columna.
4. Agregar **750 ul de buffer PE** a la columna QIAquick y centrifugar por **1 min a 13000 rpm**.
5. Descartar el sobrenadante y centrifugar nuevamente
6. Desechar el sobrenadante y el tubo de colección y rehusar la columna.
7. Ubicar la columna QIAquick en un tubo de 1.5 ml (no incluido).
8. Adicionar **50 µl de buffer EB**.
9. Incubar **5 min** a temperatura ambiente.
10. Centrifugar, descartar la columna y almacenar el nuevo tubo que contiene el DNA.

A10. SECUENCIAS CONSENSO DE LAS ORQUIDEAS

MatK.

```
>1MC_matK
TCCTATATCCGCTACTCCTTCAGGAGTATATTTACTCACTTGCTCATTATAATAGCTT
CAATAGTTTGATTTTTTACGAACCTGTGAAATTATGGTTATGACAATAAATCTAGT
TTAGTACTTGTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTCTT
CGTTGAATGATCTAACCAAAATGAATTTTGGGGGCACAAGAATTATTTTTCTTCTCA
```

TTTTTCTTCTCAAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCAATCTGGAAATCCATTCTCG
TCACGATTAGTATCTTCCCTTGAAGAAAAAGAATACCAAAATATCAGAATTTACGAT
CTATTCATTCCATATTTCCCTTTTTAGAGGATAAAATATCACATTTAAATTTATGTGTC
AGATCTACTAAATACCCCATCCCATCCATCTGGAGATCTGGTTCAAATCCTTCAAATGT
TGGATCAAAGATGTTCCCTTCTTTGCATTTATTGGCATTGTTTTTCCACGAATATCATA
ATTTGAATAGTCTCATTACTTCAAAGAAAGCCATTTACGTCCTTTCAAAGAAAGAA
AAGATTTCTTTGGTTCCTACATAATCTTATGTATATGAATGCGAATATCTATTCCTT
TTTCTTCGTAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTT

>2MC_matK

TATATTTACTCACTTGCTCATTATAATAGCTTCAATAGTTTGAATTTTTACGAACCTG
TGGAAATCTTGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTAATTAC
TCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTCTTCGTTGAATGATTCTAACCAAAATGAA
TTTTGGGGCACAAGAATTATTTTTCTTCTCATTTTTTCTTCTCAAATGGTATCAGAAG
GTTTTGGAGTCAATCTGGAAATCCATTTCTCGTCACGATTAGTATCTTCCCTTGAAGA
AAAAAGAATACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCCATATTTCCCTTTTTA
GAGGATAAATTTCTCACATTTAAATTTATGTGTCAGATATACTAAATCCCAATCCCATCC
ATCTGGAGATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGTTGGATCAAAGATGTTCTTCTTTGCA
TTTATTGCGATTGTTTTTCCACGAATATCATAATTT

>3MC_matK

AAAAAAAATAGTTTTTCGGCAACAAAACCTTCCTATATCCGCTACTCCTTCAGGAGTATA
TTACTCACTTGCTCATTCTAATAGCTTCAATAGTTTGATTTTTTACGAACCTGTGGA
AATTTATGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTAATTACTCGA
ATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTCTTCGTTGAATGATTCTAACCAAAATGAATTTT
GGGGCACAAGAATTATTTTTCTTCTCATTTTTTCTTCTCAAATGGTATCAGAAGGTTT
TGGAGTCAATCTGGAAATCCATTTCTCGTCACGATTAGTATCTTCCCTTGAAGAAAA
AGAATACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCCATATTTCCCTTTTTAGAGG
ATAAATATCACATTTCAATTTATGTGTCAGATCTACTAAATCCCAATCCCATCCATCC
GGAGATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGTTGGATCAAAGATGTTCTTCTTTGCATTTA
TTGCGATTGTTTTTCCACGAATATCATAATTTGAATAGTCTCATTACTTCAAAGAAAG
CCATTTACGTC

>4MC_matK

AGGAGTATATTTACTCACTTGCTCATTCTAATAGCTTCAATAGTTTGATTTTTTACGA
ACCTGTGAAATCTTGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTTAA
ATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTCTTCGTTGAATGATTCTAACCAAA
ATAAATTTGGGGCACAAGAATCTTTTTCTTCTCATTTTTTTATTCTCAAATGGTATC
AGAAGGTTTTGGAGTCAATCTGGAAATCCATTTCTCGTCACGATTAGTATCTTCCCTT
GAAGAAAAAGAATACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCCATATTTCCCT
TTTTAGAGGATAAATATCACATTTAAATTTATGTGTCAGATTTACTAAATCCCAATCC
CATCCATCTGGAGATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGTTGGATCAAAGATGTTCTTCT
TTGCATTTATTGCGATTGTTTTTCCACGAATATCATAAATTTGAATAGTCTCATTACTT
CAAAGAAAGCCATTTACGTCCTTTCAAAGAAAGAAAGATTTCTTTTGGTTCCCTACA
TAATTTCTATGTATATGAATGCGAAT

>5MC-_matK

ATAGTTTTCGGCAACAAAACCTTCCTATATCCGCTACTCCTTCAGGAGTATATTTACTC
ACTTGCTCATTCTAATAGCTTCAATAGTTTGATTTTTTACGAACCTGTGAAATCTT
GTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTTAAATTAATCGAATGTATC

AACAGAAATCTTTGATTTCTTCGTTGAATGATTCTAACCAAAATAAATTTTGGGGACA
CAAGAATTCCTTTTCTCTCATTTTTATTCTCAAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTC
ATTCTGGAAATTCATTCTCGTCACGATTAGTATCTTCCCTTGAAGAAAAAGAATAC
CAAAATATCAGAAATTTACGATCTATTCATTCATATTTCCCTTTTTAGAGGATAAAAT
ATCACATTTAAATATGTGTGATTTACTAATACCCCATCCCATCCATCTGGAGATC
TTGGTTCAAATCCTCAATGTTGGATCAAAGATGTTCCCTCTTTGCATTTATTTGCGAT
TGTTTTTCCACGAATATCATAATTTGAATAGTCTCATTACTTCAAAGAAAGACATTTA
CGTCTTTTCAAAGAAAGAAAAGATTCTTTTGGTTCTACATAAATCTTTATGTATAT
GAATGCGAATATCTATTCCTTTTTCTTCGTAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATAT
CTTC

>6MC_matK

TAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCT
TTGATTTCTTCGTTGAATGATTCTAACCAAAAGAAATTTTGGGGACACAAGAATTCCT
TTTCTTCTCATTTTTATTCTCAAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCCTGGAAAT
TCCATTTCTCGTCACGATTAATATCTTCCCTTGAAGAAAAAGAATACCAAAATATCAG
AATTTACGATCTATTCATTCATATTTCCCTTTTTAGAGGATAAATATCACATTTAA
ATTATGTGTGATCTACTAATACCCCATCCCATCCATCTGGAGATCTTGGTTCAAAT
CCTTCAATGTTGGATCAAAGATGTTCCCTTCTTTGCATTTATTTGCGATTTGTTTTCCAC
GAATATCATAATTTGAATAGTCTCATTACTTCAAAGAAAGCCATTTACGCTTTTTCAA
AAAGAAAGAAAAGATTCTTTTGGTTCTACATAAATCTTATGTATATGAATGCGAATA
TC

>8MC_matk

TTTACTCACTTGTCTATTCTAATAGCTTCAATAGTTTGATTTTTTACGAACTGTGGA
AATCTTGGTTATGACAATAAATCTAGTTTACTACTTGTGAAACGTTTAATTACTCGA
ATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTCTTCGTTGAATGATTTCAACCAAAAGAAATTT
GGGGACACAAGAATTCCTTTTTCTTCTCATTTTTATTCTCAAATGGTATCAGAAGGTTT
TGGAGTCATTCGAAATTCATTCCTCGTCACGATTAATACTTCCCTTGAAGAAAA
AGAATACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCATATTTCCCTTTTTAGAGG
ATAAATATCACATTTAAATATGTGTGATCTACTAATACCCCATCCCATCCATCT
GGAGATCTTGGTTCAAATCCTCAATGTTGGATCAAAGATGTTCCCTTCTTTGCATTTA
TTGCGATTTGTTTTCCACGAATATCATAATTTGAATAGTCTCATTACTTCAAAGAAAG
CCATTTACGCTTTTTCAAAGAAAGAAAAGATTCTTTTGGTTCTACATAAATCTTAT

>11MC_matK

AAAAATAGTTTTGGCAACAAAACCTTCTATATCCGCTACTCCTTCAGGAGTATATTT
ACTCACTTGTCTATTATCATAGCTTCAATAGTTTGATTTTTTACGAACTGTGAAAT
TATGGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTTAATTACTCGAATG
TATCAACAGAAATCTTTGATTTCTTCGTTGAATGATTTCAACCAAAATGGATTTTGGG
AGCACAGAATTCCTTTTTCTTCTCATTTTTCTTCTCAAATGGTATCAGAAGGTTTTGG
AGTCATCTGGAAATTCATTCCTCGTCACGATTAGTATCTTCCCTTGAAGAAAAAGA
ATACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCATATTTCCCTTTTTAGAAGATA
AATATATCATATGATTTGATTTCTTCGTTGAATGATTTCAACCAAAATGGATTTTGGG
GATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGTTGGATCAAAGATGTTCCCTTCTTTGCATTTATTTG
CGATTTTTTTCCACGAATATCATAATTTGAATAGTCTCATTACTTCAAATAAATCCA
TTTACGCTTTTTCAAAGAAAGAAAAGATTCTTTTGGTTCTACATAAATCTTATGT

ATATGAATGCGAATATCTATTCTGTTTTCTTCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCA
ATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGG

>12MC_matK

TTCAGGAGTATATTTACTCACTTGCTCATTATCATAGCTTCAATAGTTTTATTTTTTA
CGAACCTGTGGAAATCTTGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGT
TTAATTTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTATTCGTTGAATGATTTCAACC
AAAATGGATTTTGGGGGCACAAGAATCTTTCTCTTCTCATTTTTCTCTCAAATGGT
ATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATCCATTCTCGTCACGATTAGTATCTTCC
CTTGAAGAAAAAGAATACCAAATATCAGAAATTTACGATCTATTCAATCAATATTTCC
CCTTTTAGAGGATAAATTAFCATTTAAATATGTGTCAGATCTACTAATACCCCA
TCCCATCCATCTGGAGATGGTTCAAATCCTTCAATGTTGGATCAAAGATGTTCTCTCT
TTGCATTTCTTACGATTGTTTTTCCACGAATATCATAAATTTGAATAGTCTCATTACTT
CAA

>17MC_matK

GATAGCTTTCGGCAACAAAACCTTCTATATCCGCTACTCTTTCAGGAATATATTTACT
CACTTGCTCATTATCATAACTTCAATAGTTTGATTTTTTACGAACCTGTGGAAATTA
TGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTAATTTCTCGAATGTAT
CAACAGAAATCTTTGATTTCTTCGGTGAATGATTCTAACCAAAATGAATTTGGGGGC
ACAAGAATTTCTTTCTTCTCATTTTTCTTCTCAAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGT
CATTCTAGAAATTCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTCCCTTGAAGAAAAAGAATA
CCAAAATCTCAAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTAGAGGATAAAT
TATTACATTTAAATTAATGTGTCAGATCTACTAATACCCCATCCCATCCATCTGGAGAT
CTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCCTCTTTGCATTTATTACGA
TTGTTATTTCCACGAATATCATAAATTTGAATAGTCTCATTACTTCAAAGAAATCCATTT
ACGTCTTTTCAAAAAGAAAAGAAAGATTCTTTTTGTCTTACATAAATCTTATGTATA
TGAATGCGAATATCTATT

>18MC_matK

AAAGATAGATTTTCGGCAACAAAACCTTCTATATCCGCTACTCTTTCAGGAATATATTT
ACTCACTTGCTCATTATCATAACTTCAATAGTTTGATTTTTTACGAACCTGTGGAAAT
TATTGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTAATTTACTCGAATG
TATCAACAGAAATCTTTGATTTCTTCGGTGAATGATTTCAACCAAAATGGATTTTGGG
GGCACAAGAATCTTTTTCTTCTATTTTTCTTCTCAAATGGTATCAGAAGGTTTTGG
AGTCATTTCTGGAAATTCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCCCTTGAAGAAAAAGA
ATACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCTTTTTTAGAGGATA
AATTATTACATTTAAATTAATGTGTCAGATCTACTAATACCCCATCCCATCCATCTGGA
GATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCCTCTTTGCATTTATTA
CGATTTGTTTTCCACGAATATCATAAATTTGAATAGTCTCATTAATTTCAAAGAAATCCA
TTTACGCTTTTTCAAAAAGAAAAGAAAGATTCTTTTTGTCTTACATAATTTCTTATGT
ATATGAATGCGAATATCTATTCTGTTTATTCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCA
ATATCTTCTGGAGTCTTTCT

>19MC_matK

GAAAAAAGATAGATTTTCGGCAACAAAACCTTCTATATCCGCTACTCTTTCAGGAATAT
ATTTACTCACTTGCTCATTATCATAACTTCAATAGTTTGATTTTTTACGAACCTGTGG
AAATTAATGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTAATTTACTCG

AATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTCTTCGGTGAATGATTCTAACCAAAATGGATTT
TGGGGGCACAAGAATTCCTTTCTTCTCATTCTTTCTCTCAAATGGTATCAGAAGGTT
TTGGAGTCAATCTCGAAATCCATTCCTCGTCGCGATTAGTATCTTCCCTTGAAGAAAA
AAGAATACCAAAATCTCAGAATTTACGATCTATTCATTTCAATATTTCCCTTTTTAGAG
GATAAATTATTACATTTAAATTTATGTGTCAGATCTACTAATACCCCATCCCATCCATC
TGGAGATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCCTTCTTGCATTT
ATTACGATGTCTTTCCACGAATATCATAATTTGAATAGTCTCATTACTTCAAAGAAA
TCCATTTACGTCTTTTCAAAGAAAAGAAAAGATTCTTTTTGTCTTACATAATCTT
ATGTATATGAATGCGAATATCTATTCTGTTTCTTCGTAAACAGTCTTCTATTTACG
ATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAA

>22MC_matK

GAATATATTTACTCACTTGCTCATTATCATAACTTCAATAGTTTTATTTTTACGAAC
CTGTGGAATTTATGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTGTGAAACGTTTAAAT
TACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTCTTCGGTGAATGATTTCAACCAAAAT
GAATTTGGGGGCACAAGAATTCCTTTTCTTCTCATTCTTCTCAAATGGTATCAG
AAGGTTTTGGAGTCATCTGGAAATTCATTCCTCGFCGCGATTAGTATCTTCCCTTGA
AGAAAAAGAATACCAAAATCTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCTTTT
TTAGAGGATAAATTTACATTTAAATTTATGTGTCAGATCTACTAATACCCCATCCCA
TCCATCTGGAGATCTTGGTTC

TrnL-F

>1MC_TrnL-F

TGTTTTGAAAGAAGAACGATGGAAATGAGAAGAAAAGGGATAGGTGCAGAGACT
CAATGGAAGCTGTTCTAACGAATGAAATGACTACGTTACGTACGTTACGTTAGTAGC
TAAATCTTTCTCAGAAATGACAAAAAGGATAACCTTATATACCTAAATACGATCC
TACATACTGATATAGCAAACGATTAATCACAAACCAATCTTCTATCGAATCCATTC
TGTATCTCTATATATGAAATCTAAATATTCATTTCTTCTTCTTTATATCTAGAT
TATTTCTATTTAGAAATATAGAATATTTAGATAGATTATTTAGATAATCTATTAGTCT
AAGTATATATAGAAAGCTAAAGAAAGAATATGAGATAAGGATCTATAGAACCCTCT
ATTTATAGATTTCTATTTCTTTATGAATTAGAATGATAGAGATCAAAAAATCTATGAAA
AATGGAAGAGTTATTGTGAATCACTCCAATTGAAGTTGAAAAAGAATCGAATTCGA
ATATTCAGTGATAAAATGATTCATTCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAGATTAATTG
GACGAGAATAAAGAGAGAGTCCCATTTTACATGTCAATACCAGCAACAATGAAATTTA
TAGTAAGAGGAAAATCCGTGCAATTTTTAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCCTC

>5MC-TrnL-F

AGCCAAATCTTTGTTTTGAAAGAAGAACTATGAAATGAGAAGAAAAGGGATAGGT
GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATGAAATGACTACGTTACGTACGTTAC
GTTAGTAGCTAAAATCTTTCTAGCGAAATGACAAAAAGGATAACCTTATCTACCTAAT
ACGTACGTATACATACTGATATAGCAAACGATTAATCACAAACCAATCTTCTATCGA
ATCCTATTCTGTATCTCTCTATATGAAATGAAATCTTCTATTTCTTATTTCTTTAG
ATAATATATTAGTCAAGTATATCTAGAAAGTAGAAGAAAGAATATGAGATAAGGAT
CTAGAGAAACCCTCTATTTAGAGATTTCTATTTCTCTATGAATTAGAATGATAGAGATC
AAAAATCTATGAAATGGAAGAGTTATTGTGAATCACTCCAATTGAAGTTGAAAA
AAGAATGGAATCTAATATTCAGTGAGAAAATGATTCATTCAGAGTTTGATAGATCT

TTTGAAGATGAATTGGACGAGAATAAAGAGAGAGTCCCATTTGACATGTCAATACCGA
CAACAATGAAATTTCTAGTCTCCGTGCAATTTTGAATCGTGAGGGTTCAAGT

>6MC_TrnL-F

CTATCCCGACCATTTCCCGTGCATCATCCTAGCAGAGTACTTCTATCTATGTCAATGA
AAGAAGCTAAAAAGAGAATATTAACAAATAACAAATCGGCCCTAGCCCCTGAATTTA
TTAGATATTTAAAAAGAGACTTTTTTTGTAAATGTAAGGAAAAAGATATGGACTATG
AAGATTCAAATAACAGAGATTCCTTGAACATATATGTTTCATATCATATGAAAAACAAT
GAGATTAGATTGGAAGAAGATACGAGGATTTCTATTCGGATCCATTTGTGAAAAACA
GAGTGAATGAAATGAGAACGATAATTCATTTTGTGAAACTAAGCCACTGATGAAAA
AAAAAGAAAAGAGGACGAGGATAAATAAGGAAAAGAAATAGAAAAGAAAGACGAGGA
AGTCAAATGGGCTTTTTAGTGGGGATAGAGGACTTGAACCCCTCACAATTTCAAATTT
CGACGGAGACTAGAAATTTTCATTGTTGTGCGGTATTGACATGTCAAATGGGACTCTCTC
TTTATTCTCGTCCAATTTATCTTCAAAGATCTATCAAACCTGGAATGAATCATTTTT
CTCACTGAATATTAGAATTCGATTCCTTTTTTCAACTTCAATTTGGAGTTGATTCACAAT
AATCTTCCATTTTTCATAGATTTTTTGTATCTCTATCATTTCAATTCATAGAGAATAG
AAATCTATAAATATAGGGTTTTCTATAGATCCTTATCTCATATTTCTTTCTTAGACTTT
CTATATATACTTAGACTAATAGATTATCTAAAGATTCTAGAATCTAGAATCTCAATAA
TCTAGAATCTAAAGAATAATAAATAGAAGATTTCTATTTTCATATATAGAGATACAG
AATAGGATTCGATAGAAGATTTGGGTTGTGATTAATCGTTTGTCTATATCAGTATGTAT
ACGTACGTATTAGGTAGATAAGGTTCTCCTTTTTTGTCAATTCGCTAGAAAGATTTTAG
CTACTAACGTAACGTACGTAACGTAGTCAATTTTCATTTCGTGAGAACAGCTTCCATTGA
GTCTCTGCACCTATCCCTTTTTCTTCTCATTTTTCATCGTTTCTTCTTCAAACAAG
ATTTGGC

>8MC_TrnL-F

GGGCTTTTAGTGGGGATAGAGGGACTTGAACCCCTCACAATTTCAAATTCGACGGAG
ACTAGAAATTTTCATGTTGTGCGGTATTGACATGTCAAATGGGACTCTCTCTTATCTG
CTCCAAATTTTACTTCAAAGATCTATCAAACCTCTGGAATGAATCAATTTCTCACACTA
ATATTAGAATTCGATTCCTTTTTTCAACTTCAATTTGGAGTTGATTCACAATAACTCTTC
CATTTTTTCATAGATTTTTTGTATCTCTATCATTTCTAATTCATAGAGAAATAGAAATCTAT
AAATATAGGGTTTCTATAGATCCTTATCTCATATTTCTTCTTTAGACTTTTCTATATAT
ACTTAGACTAATAGATTATCTAAAGATTCTAGAATCTAGAATCTCAATAATCTAGAAAT
CTAAAGAAATAATAAATAGAAGATTTATATTTTCATATATAGAGATACAGAATAGGAT
TCGATAGAAGATTTGGGTTGTGATTAATCGTTTGTCTATATCAGTATGTATACGTACGT
ATTAGGTAGATAAGGTTCTCCTTTTTTGTCAATTCGCTAGAAAAGATTTTAGCTACTAAC
GTAACGTACGTAACGTAGTCAATTTTCATTTCGTGAGAACAGCTTCCATTGAGTCTCTGC
ACCTATCCCTTTTTCTTCTCATTTTTTCATCGTTTCTTCTTCAAACAAGATTTGGCT

>10MC_TrnL-F

AAAAAGAGAATATTAACAAATAACAAATCGGCCCTAGCCCCTGAATTTCTTAGATAT
TTAAAAGAAAGACTTTTTTTTGTAAATGTAAGGAAAAAGATATGGACTATGAAAGATTC
AATAACAGAGATTCCTTGAACATATATGTTTCATATCATATGAAAACAATGAGATTAG
ATTGGAAGAAGATACGAGGATTTCTATTCGGATCCATTTGTGAAAAACAAGAGTGAAT
GAAATTAGAACGATATTTTCATTTTGTGAAACTAAGCCACTGATGAAAAAAGAAAAAG
AAAGAGACGAGGATAAATAAAGAGAAATAAAGAGCGAGGAGTCAAATGGGCTTTTTT
AGTGGGGATAGAGGGACTTGAACCCCTCAGATTTCAAATTCGACGGAGACTAGAAAT
TTCATTGTGTGCGGTATTGACATGTCAAATGGGACTCTCTCTTTATTCCTCGTCCAATT
CATCTTCAAAGATCTATCAAACCTCTGGAATGAATCATTTTTCTCACTGAATATTAGAA
TTCCATTTCTTTTTTCAACTTCAATTTGGAGTTGATTCAAAATAACTCTTCCATTTTTTCA

TAGATTTTTTGATCTCTATCATTCTAATTCATAGAGAATAGAAATCTCTAAATAGAGG
GTTTCTCTAGATCCTTATCTCATATTTCTTTCTTCTACTTTCTAGATATACTTAGACT
AATATATTATCTAAAGAAATAAGAAATAGAAGATTTCTATTTTCATATAGAGAGATAC
AGAATAGGATTCGATAGAAGATTTGGGTGTGATTAATCGTTTGCATATCAGTATGT
ATACGTACGTATTAGGTAGATAAGGTTATCCCTTTTTGTCAATTCGCTAGAAAGATTTT
AGCTACTAACGTAACGTACGTAAACGTAGTCAATTTCAATTCGTTAGAACAGCTTCCATT
GAGTCTCTGCACCTATCCCTTTTTCTTCTCATTTTCATAGTTTCTTCTTCAAACAA
AGATTTGGCTC

>11MC_TrnL-F

GCTATCCCGACGATTTCCCCCTAGCAGAGTACTTATATCTATGTCAATGAAAAGA
AAAAAGAAAAGAGGACGAGGATAAAATAAGAGCGAGGAAGTAAAATGGGCTTTTTAGT
GGGGATAGAGGACTTGAACCCCTCACGATTTCAAATTCGACGGATTTTCTCTTACT
ATAAATTCATTGTTGTGGTATTGACATGTAAAATGGGACTCTCTCTTTATCTCGT
CCGATTAATCTCAAAGATCTATCAAACCTCTGGAATGAATCATTGATCACTGAATA
TTCGAATTCGATCCTTTTTCAACTTCAATTGGAATTGATTCACAATAACTCTTCAAT
TTTTCATATATTTTTTGATCTCTATCATTCTAATTCATAGAGAATAGAAATATAGAAC
TAGAGGTTTTCTATAGATCCTTATCTCATCTTATTTCTTTAGACTTTCTATATATACT
TAGACTAATAGATTATCTAAATATTTAGAAATATAAATAAATCTAGAAATATAAGAAAG
AAGAAATAGAAGAGAAGAAGAAATAGAAGATTTGGGTTGTGATTAATCGTTTGCAT
ATCAGTATGTATACGTACGTATTAGATATATAATGTTATCCCTTTTTGTCAATTCGATA
GAAAGATTTTAGCTACTAACGTAACGTACGTAAACGTAGTCAATTTCAATTCGTTAGAAC
AGCTTCCATTGAGTCTCTGCACCTATCCCTTTTTCTTCTCAT

>13MC-TrnL-F

ATCTTTGTTTTGAAAGAAAACGATAGAAAATGAGAAGAAAAGGGATAGGTGCAGAG
ACTCAATGGAAGCTGTCTAAACGAATGAAATGACTACGTTACGTACGTTACGTTAGT
AGCTAAAATCTTTCTATCAAATGACAAAAGGATAACCTTATATACCTAATACGTAC
GTATACATACTGATATAGCAAACGATTAATCACACCCTTCTTCTATTTCTCTTT
CTTTAGATTTCTTCTTTCTTTAGATTCTAGATTATCTCTATTTCTAGAAATAGAGAAT
TTATCTAATAGATTTAGATAATATATAGTCTAAGTATCTAAGTATATATAGAAGCT
AAGCATATATAGACAGTCTAAAGAAATAAGATGAGATAAGGATCTATGAAAACCCCT
AGTTCTATATTTATTTCTCTATGAATTAGAATGATAGAGATCAAACCTAATGAAA
AATGGAAGAGTTATTGTGAATCAATTCCAATGAAAGTTGAAAAAGAATCGAATTCAA
ATATTCAGTGATCAAATGATTCAATCCAGAGTTGATAGATCTTTTGAAGATTAATCG
GACGAG

>14MC_TrnL-F

GTTGTCGGTATTGACATGTAAAATGGGACTCTCTCTTTATTTCTCGTCCGATTAATCTT
CAAAAGATCTATCAAACCTCTGGAATGAATCATTGATCACTGAATATTTGAATTCGAT
TCTTTTTTCAACTTCAATTGGAATTGATTACAATAACTCTTCAATTTTTCATATAGT
TTTTGATCTCTATCTAATTTCAATTCATAGAGAATAGAAATAGAAATGAACTAGAGGTTCT
ATAGATCCTTATCTCATCTTATTTCTTTAGACTGTCTATATATACTTAGACTTCTATA
TATACTTAGATACTTAGACTAATAGATTATCTAAATCTATTAGATAAATATCTCTAT
TCTAGAATAGAATAAATCTAGAATCTAAAGAAAGAAGAAATCTAAAGAAAGAAGAAAT
AGAAGATTTGGGTGTGATTAATCGTTTGCATATATCAGTATGATATAGACTAGGTTAG
GTATATAAGGTTATCCCTTTTTGTCAATTCGATAAAAAGATTTTAGCTACTAACGTAAT
GTACGTAACCTTAGTCAATTTCAATTCGTTAGAACAGCTTCCATTTAGTCTCTGCACCTA
TCCCTTTTTCTTCTCATTTCCATCGTTTCTTCTTTCAAACAAAGATTTGGCTCAGG
ATTGCCATTTTTAATTCAGGGTTTTCTCTGAATTGGAAGTTACCCTAGCAGGT

>15MC_TrnL-F

AAAAAAGAAAAATATTAACAAATCGGCCCTAGCCCCGTAATTTATTAGATATTCAAAA
TAAGACTCTTTTGTCAATGTAAAGAAAAAGATATGGACTATGAATGATTAATAACG
GAGATTCCTTGAACATATATGTTTCATATCATATTATACAAAAACAAAACAAATGAGATT
GGATTGGAAGAAGATACGAGGATTTCTATTTCGGATCCATTTGTGAAAGAACAGAGTGA
ATGAATTTAGAACGATATTTCAATTTGTTGAAACTGAGCCACTGATGAAAAAAAAAAAA
GAAAGAGGACGAGGATAAATAAAGAGCGAGGAAGTAAAATGGGCTTTTATTAGTGGGGAT
AGAGGGACTTGAACCCCTACGATTTAAAAATTCGACGGATTTTCTCTTACTATAAAT
TTCATTGTTGTGGTATTGACATGTAATAATGGGACTCTCTCTTTATCTCGTCCGATT
AATCTTCAAAAGATCTATCAACTCTGGAATGAATCATTTGATCACTGAATATTTGAA
TTCGATCTTTTTCAACTTCAATTGGAATTGATTCACAATAACTCTCAATTTTCA
TATAGTTTTGATCTCTATCATTTCTAATTCATAGAGAATAGAAATATAGAACTAGAGG
GTTTCTATAGATCCTTATCTCATCTTATTTCTTTAGACTGTCTATATATACTTAGACT
AATATATTAGATAAATATTTCTTATTTCTAGAAATAGAAATAATCTAGAATCTAAAGAAA
GAAGAAATAGAAGATTTGGGTTGTGATTAATCGTTTGCTATATCAGTATGTATACGTA
CGTATTAGGTATATAAGGTTATCCTTTTTGTCATTTTCGATAGAAAGATTTTAGCTACT
AACGTAACGTACGTAACGTAGTCAATTTCAATTCGTTAGAACAGCTTCCATTGAGTCTC
TGCACCTATCCCTTTTTCTTCTCATTTTCCATCGTTTCTTCTTTCAAAACAAAGATTT

>16MC_TrnL-F

CAACTAAAAAGAAAAATATTAACAAATGGGCCCTAGCCCCGTAATTTCTTAGATCTTC
AAAAAGAGACTTTCTTTGTAATGTAAAGAAAAAGATATGGACTATGAATGATTCAA
TAACGGAGATTCCTTGAACATATATGTTTCATATCGTATTATACAAAAACAAAAAATAA
ATGAGATTGGATTGGAAGAAGATACGAGGATTTCTATTTGTATTCTCTTTTGTGAAAGAA
CAGAGTAAATGAAATTAGAACGATATTTCAATTTGTTTAACTGAGCCACTGATGAAA
AAAAAAGAAAGAGGATGAGGATAAAGAAAGAGCGAGGAAGTAAAATGGGCTTTTTAT
TGGGGATAGAGGGACTTGAACCCCTACGATTTAAAAATTCGACGGATTTTCTCTTAC
TATAAATTTCAATTTGTTGATATTGACATGTAATAATGGGACTCTCTTTTGTCTCG
TCCGATTAATCTTCAAAAGATCTATCAACTTTGGAATGAATCATTTGATCACTGAAT
ATTCGAATTCGATCTTTTTTCAACTTCAATTGGAATTGATTCACAATAACTCTTCCA
TTTTTCATCTATTTTTTGATCTCTATCATTTCAATTCATAGAGAATAGAAATGTAGAA
ATAGAGGTTTTCTATAGCTTATCTCATACTATAATAGGATTTCGATTAAGATAATTG
GGTTGTGATTAATCGTTTGTCTATGTCTAGTATGTATACGTAGTATTAGGTATAAAGG
TTATCTTTCTGTCAATTCGATAGAAGGTTTTAGCTACTAACGTACGTAGTCAATT
TCATTCGTTAGAACAGCTTCCATTGAGTCTCTGCACCTATCCCTTTTTATTCTCATTT
TCCATCGTTTTTCTCTCAAAACAAAGATTTGGCTCAGGA

>17MC_TrnL-F

GAAAAAAGAAAGAGGATGAGGATAAATAAAGAGCGAGGAAGTAAAATGGGCTT
TTTATTGGGGATAGAGGGACTTGAACCCCTACGATTTAAAAATTCGACGGATTTTCTCT
CTTACTATAAATTTCAATTTGTGTCGGCATTGACATGTAATAATGGGACTCTCTTTAT
TCTCGTCCGATTAATCTTCAAAAGATCTATCAACTTTGGAATGAATCATTTGATCAC
TGAATATTTGAATTCGATCTTTTTTCAACTTCAATTGGAATTGATTCACAATAACTC
TTCCATTTTAAATATATTTTTGATCTCTATCATTTCAATTCATAGAGAATAGAAATG
TAGAAATAGAGGTTTTCTATAGATCCTTATCTCATACTATAATAGGATCTCAATATAAG
ATTTGGGTTGTGATTAATCGTTTGTCTATGTCTAGTATGTATACGTACGTATTAGGTATA
TAAGGTATCCCTTCTGTCAATTCGATAGAAGGTTTTAGCTACTAACGTACGTAGT
CAATTTCAATTCGTTAGAACAGCTTCCATTGAGTCTCTGCACCTATCCCTTTTTATTCT

CATTTTCCATCGTTTTTCTCTCAAAACAAAGATTTGGCTCAGGATTGCCCTTTTTTA
GTTCCAGGGTTTCTCTGAATTGGAAGTTAT

>18MC_TrnL-F

AACTAAAAAGAAAATATTAACAAATTGGCCCTAGCCCCTGAATTTCTTAGATCTTCA
AAAAGAAGACTTCTTTGTAATGTAAGGAAAAAGATATGGACTATGAATGATTCAAT
AACGGAGATTCCCTGAAACATATATGTTTCATATCGTATTATACAAAACAAAAAATAAA
TGAGATTGGATTGGAAGAAGATACGAGGATTTCTATTTGTATCCTTTTGTGAAAGAAC
AGAGTAAATGAAATTAGAACGATATTTTCATTTTGTTTAAACTGAGCCACTGATGAAAA
AAAAAGAAAGAGGATGAGGATAAAGAAAGAGCGAGGAAGTAAAATGGGCTTTTTATT
GGGGATAGAGGGACTTGAACCCCTCACGATTTAAAAATTCGACGGATTTTCCTCTTACT
ATAAATTTTCATGTTGTCGATATTGACATGTAAAATGGGACTCTCTCTTTATTCTCGT
CCGATTAATCTTCAAAAGATCTATCAAACCTTGGAAATGAAATCATTGATCACTGAATA
TTCGAATTCGATCTTTTTTCAACTTCAATTGGAATTGATTCACAATAACTCTTCCAT
TTTTTCACTATTTTTTGTATCTATCATTCTAATTCATAGAGAATAGAAAATGTAGAAA
TAGAGGGTTTCATAGATCCTTATCTCATACTATAATAGGATTCGATATAAGATTGGG
GTTGTGATTAACGTTTGTCTATGTCAGTATGTATACGTACGTATTAGGTATATAAGGT
TATCCTTTCTGTCAATTCGATAGAAGGGTTTTAGCTACTAACGTAACGTAGTCAATTT
CATTCGTTAGAACAGCTTCCATTGAGTCTCTGCACCTATCCCTTTTTATTCTCATTTT
CCATCGTTTTTCTCTCAAAACAAAGATTTGGCTCAGGA

>19MC_TrnL-F

CTAAAAAGAAAATATTAACAAATTGGCCCTAGCCCCTGAATTTGCTTAGATCTTCAA
AAGAACTACTTTCTTTGTAATGTAAGGAAAAAGATATGGACTATGAATGATTCAATA
CGGAGATTCCTTGAACATATATGTTTCATATCGTATTATACAAAACAAAAAATAAATG
AGATTGGATTGGAAGAAGATACGAGGATTTCTATTTGTATCCTTTTGTGAAAGAACAG
AGTAAATGAAATTAGAACGATATTTTCATTTTGTTTAAACTGAGCCACTGATGAAAAAA
AAAAGAAAAGAGGATGAGGATAAATAAAGAGCGAGGAAGTAAAATGGGCTTTTTATTGG
GGATAGAGGGACTTGAACCCCTCACGATTTAAAAATTCGACGGATTTTCCTCTCAT
AAATTTTCATGTTGTCGGTATTGACATGTAAAATGGGACTCTCTCTTTATTCTCGTCC
GATTAATCTTCAAAAGATCTATCAAACCTTGGAAATGGATCATTGATCACTGAATATT
TGAATTCGATCTTTTTTCAACTTCAATTGGAATTGATTCACAATAACTCTTCCATTT
TTCATATATTTTTTGTGATCTCTATCATTCTAATTCATAGAGAATAGAAATGTAGAAATA
GAGGGTTTCTATAGATCCTTATCTCATACTATAATAGGATTCAAATAAAGATTGGGGT
TGTGATTAATCGTTTGTCTATGTCAGTATGTATACGTACGTATTAGGTATATAAGGTTA
TCCTTTCTGTCAATTCGATAGAAGGGTTTTAGCTACTAACGTAACGTAGTCAATTTCA
TTCGTTAGAACAGCTTCCATTGAGTCTCTGCACCTATCCCTTTTTATTCTCATTTTCC
ATCGTTTTTCTCTCAAAACAAAGATTTGGCT

>20MC_TrnL-F

AGAACTAAAAAGAAAATATTAACAAATTGGCCCTAGCCCCTGAATTTCTTAGATCTT
CAAAAAGAAGACTTTCTTTGTAATGTAAGGAAAAAGATATGGACTATGAATGATTCA
ATAACGGAGATTCCCTGAAACATATATGTTTCATATCGTATTATACAAAACAAAAAATA
AATGAGATTGGATTGGAAGAAGATACGAGGATTTCTATTTGTATCCTTTTGTGAAAGA
ACAGAGTAAATGAAATTAGAACGATATTTTCATTTTGTTTAAACTGAGCCACTGATGAA
AAAAAGAAAGAGGATGAGGATAAAGAAAGAGCGAGGAAGTAAAATGGGCTTTTTTA
TTGGGGATAGAGGGACTTGAACCCCTCACGATTTAAAAATTCGACGGATTTTCCTCTTA
CTATAAATTTTCATGTTGTCGATATTGACATGTAAAATGGGACTCTCTCTTTATTCTC
GTCCGATTAATCTTCAAAAGATCTATCAAACCTTGGAAATGAATCATTGATCACTGAA
TATTCGAATTCGATTCTTTTTCAACTTCAATTGGAATTGATTCACAATAACTCTTCC

ATTTTTTCATCTATTTTTTGATCTCTATCATTCTAATTCATAGAGAATAGAAATGTAGA
AATAGAGGGTTTCTATAGATCCTTATCTCATACTATAATAGGATTCGATATAAGATTT
GGGTTGTGATTAATCGTTTGCATGTCTAGTATGTATACGTACGTATTAGGTATATAAG
GTTATCCTTTCTGTCAATTCGATAGAGGGTTTAGCTACTAACGTAACGTAGTCAAT
TTCATTCGTTAGAACAGCTTCCATTGAGTCTCTGCACCTATCCCTTTTTATTTCTCATT
TTCCATCGTTTTTCTCTCAAAACAAAGATTTGGCTC

>21MC_TrnL-F

GAAAAGAACTCAAAAATAAAATCTTAAATCTTAACAAATTTGGCCCTAGCCCTGAATT
TCTTAGATCTTCAAAAAGAAGACTTTCTTTGTAATGTAAAGTAAAAAGATATGGACTA
TGAATGATTAATAACGGAGATTCCTTGAACATATATGTTTCATATCGTATTATACAAA
ACAAATGAGATTTGGATTGGAAGAAGATATGAGGATTTCTATTCGTATCCATTTGTGTT
GGAAGAAGATACGAGGATTTCTATTCGTATCCATTTGTGAAAGAACAGAGTGAATGAA
ACGAGAAGATATTTTCATCTTTAAACTGAGCCACTGATGAAAAAAAAGAAAAGAGG
ATGAGGATAAATAAAAAGCGAGGAAGTAAATGGGCTTTTTCTTTGGGGATAGAGGGAC
TTGAACCTCACGATTTAAAAATTCGACGGATTTTCTTACTATAAAATTCATTGT
TGTCGGTATTGACATGTAATAATGGGACTCTCTTTTATTCTCGTCCGATTCTTTTTC
AACTTCAATTAGAATTGATTCACAATAACTCTTCCATTTTTCATATCTTTTTTGATCT
ATATTCATATTTAATTAATAGAGAATAGAAATAGAGGGTTTCTATTTTCATAT
ATAGAGATACAGAATAGGATTTGATAGAAAGATTTGGGTTGTGATTAATCGTTTGCTAT
GTCAGTATGTATACGTACGTATTAGGCATATAAAGTTATCCTTTCTGTCATTTTCGATA
GAAAGATTTTAGCTACTAACGTAACGTAGTCAATTTCAATTCGTTAGAACAGCTTCCAT
TGAGTCTCTGCACCTATCCCTTTTTATTTCTCATTTTCCATCTTTTTTCTCTCAAAA
AAGATTTGGCTCAGGATTTGCCCATTTTTAGTT

>22MC_trnL

AAAAGAACTAAAAAGAAAAATTAACAAATTTGGCCCTAGCCCTGAATTTCTTAGAT
CTTCAAAAAGAAGACTTTCTTTGTAATGTAAAGTAAAAATATATGGACTATGAATGAT
TCAATAACGGAGATTCCTTGAACATATATGTTTCATATCGTATTATACAAAACAAAA
ACAAATGAGATTTGGATTGGAAGAAGATACGAGGATTTCTATTTGATTCCTTTTGTGAA
AGAACAGAGTAAATTAATTAAGAACGATATTTTCATTTTGTTTAAACTGAGCCACTGAT
GAAAAAAAAGAAGAGGATGAGGATAAATAAAGAGCGAGGAAGTAAATGGGCTTTTT
ATTTGGGATAGAGGACTTGAACCTCACGATTTAAAAATTCGACGGATTTTCTCTT
ACTATAAATTTCAATTTGTCGGTATTGACATGTAAATGGGACTCTCTTTTATTCT
CGTCCGATTAATCTTCAAAAGATCTATCAAACCTTTGGAATGAATCATTGATCACTGA
ATATTTGAATTCGATTTCTTTTTCAACTTCAATTTGGAATGATTACAATAACTCTTC
CATTTTTTCATATATTTTTTGATCTCTATCATTCTAATTCATAGAGAATAGAAATGTAG
AAATAGAGGATTTCTATAGATCCTTATCTCATACTATAATAATAATAGGATTCATAT
AAGATTTGGGTTGTGATTAATCGTTTGTATGTCTAGTATGTATACGTACGTATTAGGT
ATATAAGGTTATCCTTTCTGTCAATTTTCGATAGAAGGGTTTTGGCTACTAACGTAACGT
AGTCAATTTCAATTCGTTTGAACAGCTTCCATTTGAGTCTCTGCACCTATCCCTTTTTAT
TCTCATTTTCCATCGTTTTTCTCTCAAAA

ITS

>1MC_ITS

AGCCGCCATCCGTGGATCAACGCTTTGGGCTGGGATCATCCGCATGGTATAATCTCCTC
TCTGGCCGGCACGATACATCACAGGCACAATTTTCATCCACCTTTGCTGCTCGTGGCC

AACGAGACGATCACCAACTCTTAAGCCCGCCGCGCCGAGGCACGACGAGCCACTCT
ACACATCCGGCCCTCCCGCATGCACACCCTTCGGGTGGGATGGAGCTGGCACAAGCA
ACGCAACGCTTGACGCCACGGCGACGTGCCCTTGGCCGGCTGGCCTGGGGCGAACT
TGCGTTCAAATCTCGATGGTTCGCGGGATTTCGAATTCGCACCACGATTCGCATTT
CGCTGCGCTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCATTCGCCGAGAGTCATTTTGAT
CCGTGCGGGGCGCAATAGCACCCACGCCATCGAACCCGATGCGGGCTCGTGTTCAT
TGTATTCCTTGGCGCTAGCTGCGCCGATTTGAGTTTCAGCTGCCCTCATCGCGGC
CTGAAAGGAGGCCAAC

>2MC_ITS

GCCCGCATCGGGTTCGATGGCGTGGGGTGTATTGCGCCCCACACGGATCAAAATGAC
TCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCRAAATGCGATAC
GTGGTGCGAATTGCAGAAATCCCGCAACCATCGAGAATTTGAACGCAAGTTGCGCCCG
AGGCCACGGCCAAAGGCGACGTCCGCTGGGCGTCAAGCGTTGCGTTGCTTCGTGCC
AGCCCCATCCACCCRAAGGTGTGCATGCGGGAGGGCCGGATGTGCAGAGTGGCTCG
TCGTGCCCGCGGGCGCGGGCTTAAGAGTTGGTGATCGTCTCGTTGCCACGAGCA
GCAAGGTTGGATGAAAATTTGCTCTGTGATGCATCGTGCCCGCCAGAGAAGAGATTAT
AC

>3MC_ITS

AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAGACCAAAATATATCGAGCGATTTGGAGAACCCTGT
GACTAAGCGATGGCACTAGCCATCGCGTGACAGCCATCCTGGTGTGGCTCCTTTC
AGGCCGCGATGAGGGGCGAGCTGAAACTCAAATCGGGCGAGCTACGGCCAAAGGGAATA
CAATGAAAACAGGACCCCGCATCGGGTTCGATGGCGTGGGGTGTATTGGCCCCGCAC
GGATCAAAATGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAG
CGAAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCAACCATCGAGAATTTGAACG
CAAGTTGCGCCCGAGGCCAGCCGGCCAAAGGCGACGTCCGCTGGGCGTCAAGCGTTGC
GTTGCTTCGTGCCAGCTCCATCCACCCGAAGGTTGTGCATGCGGGAGGGCCGGATGT
GTAGAGTGGCTCGTCTGGCTTGCAGGGCGCGCGGGCTTAAGAGTTGGTGATCGTCTCG
TTGGCCACGAGCAGCAAGGTTGGATGAAAATTTGCTCTGTGATGTATCGTGCCGCCA
GAGAGGAGATTATACCATGCGGATGATCCCAGCCAAAGCGTTGATCCACGGAT

>4MC_ITS

TTGAGGCCGCGATGAGGGGCGAGTGAAACTCAAATCGGGCGAGCTACGGCCAAAGGGA
ATACAATGAAACACGAGCCCGCATTTGGTTCGATGGCGTGGGGTGTATAGCGCCCG
CACGGATCAAATGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCG
CAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCAACCATCGAGAATTTGA
ACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAGCCGGCCAAAGGCGACGTCCGCTGGGCGTCAAGCGT
TACGTTGCTCCGTGCCATCTCCATCCCACCCGAAGGTTGTGCATGCGGGAGGGTCGGA
TGTGTAGAATGGCTCGTCTGCCCGGGGCGTGGCGGGCTAAAGAGTTGGTGATCATC
TCGTTGGCCACGAGCAGCAAGGTTGGATGAAAATTTGCTCTGTGATGTATCGTGCCG
GCCAGAGAAGAGATTATACCATG

>5MC_ITS

TGTTGGCTCGTTGAGGCCACGATTAGGGGCGAGCTGAAACTCAAATCGGGCGAGCTAC
GCGCAAAGTAATACAATGAAACACGAGCCCGCATCGGGTTCGATGGCGTGGGGTGT
ATAGCGCCCGCAGCGATCAAATGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATC
GATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCAACCAT
CGAGAATTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAGCCGGCCAAAGGCGACGTCCGCTGG
CGCTCAAGCGTTACGTTGCTCCGTGCCATCTCCATCCCACCCGAAGGTTGTGCATGCG

GGAGGGTCGGATGTGTAGAAATGGCTCGTTCGTCGCCCCGGGCGTGGCGGGCTAAAGAGT
TGGTGATCGTCTCGTTGGCCACGAGCAGCAAGGGGTGGATGAAAATGTGCCTGTGAT
GTATCGTGGCGCCAGAGAAGAGATTATATACC

>6MC_ITS

GCGCAGCTACGCGCCAAGGTAATACAATGAAACACGAGCCCGCATCGGGTTCGATGGC
GTGGGGTGCTATAGCGCCCCGCACGGATCAAAAAGACTCTCGGCAATGGATATCTCGG
CTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAAATGCGATACGTGGTGCGAATTCGAGAATCC
CGCGAACCATCGAGAATTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCCGGCCGAGGGCAC
GTCCGCTGGGGTCAAGCGTTACGTTCGCTCCGTGCCATCTCCATCCCACCCAAAGGG
TGTGCATGCGGGAGGTCGGATGTGTAGAAATGGCTCGTTCGTCGCCCCGGGCGTGGCGGG
CTAAAGAGTTGGTGATCGTCTCGTTGGCCACGAGCA

>7MC_ITS1

TGGCCTCTTTGAGGCCGCGATGAGGGGAAGCTGAAACTCAAATCGGCGCAGCTACGCG
CCAAGGAATAACAATGAAACACGAGCCCGCATCGGGTTCGATGGCGTGGGGTGTCTATA
GCGCCCCGCACGGATCAAAAAGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGAT
GAAGAGCGCAGCGAAAATGCGATACGTGGTGCGAATTCGAGAATCCCAGAACCATCGA
GAATTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCCAGCCGGCCAAGGGCACGTCGCGCTGGGCG
TCAAGCGTTACGTTGCTCCGTGCCATCTCCATCCCACCCGAAGGGTGTGCATGCGTGA
GGTTCGATGTGTAGATGGCTCGTTCGTCGTCGCTCGCCCTCGGGCGCAGCGGGCTTAAG
TGATCGTCTCGTAGGCCACGAGCAGCAAGGGGTGGATGAAAATGTGCCTGTGATGTA
TCGTGGCGCCAGAGAAGAGATTATACCATACAGATGATCCCAGCCGAGCGTCGATC
CATAGATGGCGGCTTGAATGCGACCCAGGATGGGCGAGGCCACCCGCTGAGTTTAA
GCATATCAATAAGCGGAGGAA

>8MC_ITS

CAATCCTGGTTGTTGGCTCGTTGAGGCCGCGATGAGGGGCAGCTGAAACTCAAATCG
GCGCATACGCGCCAAGGTAATACAATGAAACACGAGCCCGCATCGGGTTCGATGGC
GTGGGGTGCTATAGCGCCCCGCACGGATCAAAAAGACTCTCGGCAATGGATATCTCGG
CTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAAATGCGATACGTGGTGCGAATTCGAGAATCC
CGCGAACCATCGAGAATTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCCGGCCGAGGGCAC
GTCCGCTGGGCGTCAAGCGTTACGTTGCTCCGTGCCATCTCCATCCCACCCAAAGGG
TGTGCATGCGGGAGGTCGGATGTGTAGAAATGGCTCGTTCGTCGCCCCGGGCGTGGCGGG
CTAAAGAGTTGGTGATCGTCTCGTTGGCCACGAGCAGCAAGGGGTGGATGAAAATGT
GCTGTGATGTATCGTGGCGCCAGAGAAGAGATTATACCATGCAGATGATCCCAGCC
CAAGCGTTGATCC

>9MC_ITS

ACTCAAATCGGCGCAGCTACGCGCCAAGGGAATACAACGAAACACGAGCCCGCATCGG
GTTTCGATGGCGTGGGGTGCTATAGCGCTCGCACGGATCAAAAAGACTCTCGGCAATG
GATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAAATGCGATACGTGGTGCGAAT
TGCAGAATCCCAGAACCATCGAGAATTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCCAGCCGG
CCAAGGGCACGTCGCGCTGGGCGTCAAGCGTTACGTTGCTCCGTGCCATCTCCATCCC
ACCCGAAGGGTGTGCATGCGGGAGGGTCCGATGTGCAGAGTGGCTCGTTCGTCGCTCG
GGCGCACGGGCTTAAGAG

>10MC_ITS

TTGTTGGCCTCGTTGAGGCCACGATTAGGGGCAGCTGAAACTCAAATCGGCGCAGCTA
CGCGCCAAGGTAATACAATGAAACACGAGCCCGCATCGGGTTCGATGGCGTGGGGTGC

TATAGCGCCCCGCACGGATCAAAATGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCAT
CGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCGAATCCCGCGAACCA
TCGAGAATTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCCAGCCGGCCAAGGGCAGCTCCGCCCTG
GGCGTCAAGCGTACGTTGCTCCGTCCGTGCCATCTCCATCCCACCCGAAGGGTGTGCATGC
GGGAGGGTTCGGATGTGTAGAATTGGCTCGTCTGCCCCGGGCGTGGCGGGCTAAAGAG
TTGGTGTATCGTCTCGTTGGCCACGAGCAGCAAGGGTGGATGAAAATTGTGCCTGTGA
TGTATCGTGGCGGCCAGAGAAGAGATTATATACCATGCAGATGATCCCAGCCCAAGCG
TCGATCCAGGATGGCGGCTTGAATG

>12MC_ITS

TCATTGTCGAGACCGAATATATTCGAGCGATTTCAGAGAACCCTGAAACGAGCGATGGCA
CTTGCCGTTCGGTACATTCGTCCCTGTTGTGCGGCTTATCGTGGCCATGATGGGGGCG
GATAAACTCAAACCGCGCAGCTACGCGCCAAGGCAATGCAAATAGACACGAGCCCG
CATCGGTTTGGTGGCGTGGAGTGCTTCTGCACACCACACGGATCAAAATGACTCTCG
GCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGT
GCGAATTGCGAATCCCGCGAACCATCGAGAATTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCC
AGCCGGCCAAGGGCAGCTCCGCTGGGCGTCAAGCGTTGCGTCCGCTCCGCTAGCTC
CATCCCACCTGACTGGTGTGCATGGAGACGGCCGGATGTGCAGAGTGGCTCGTCTGTT
CCACGGGTGCGACGGGCTGAAGAGCGGGTGTATCGTCTCGTTGGCCACGAACAAGG
GGTGGATGAAAATTGTGCCTGTGTTGTATCGTGTGCACATGAGAAGAGATCATACCT
CGGGATGATCCCAACCAAGCGTTATTCACGGATGGCGGCTTGGAAATGCGACCCC

>13MC_ITS

TGCGGAAGGATCATTTGTCGAGACCGAATATATTCGAGCGATTTCAGAGAACCCTGAAACG
AGCGATGGCACTTGTGTGCGGTACATTCGTCCCTGTTGTGCGGCTCATCGTGGCCAT
GATGGGGGCGGATAAACTCAAACCGCGCAGCTACGCGCCAAGGCAATGCAAATAGA
CACGAGCCCGCATCGGTTTGGTGGCGTGGAGTGCTTCTGCACACCACACGATCAAAA
TGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCG
ATACGTGGTGCGAATTGCGAATCCCGCGAACCATCGAGAATTGAACGCAAGTTGCG
CCCGAGGCCAGCCGGCCAAGGGCAGCTCCGCTGGGCGTCAAGCGTTGCGTCCGCTCCG
TGCTAGCTCCATCCCACCTGACTGGTGTGCATGGAGACGGCCGGATGTGCAGAGTGGC
TGTGCTGTTCCACGGGTGCGACGGGCTGAAGAGCGGGTGTATCGTCTCGTTGGCCACGA
ACAACAAGGGTGGATGAAAATTGTGCCTGTGTTGTATCGTGTGCACATGAGAAGAGA
TCATACCTGCGGATGATCCCAACCAAGCGTTATTCACGGATGGCGGCTTGGAAATG
CGACCCAGGATGGGCGAGGCCACCCGCTGA

>14MC_ITS

TCGTGGCCATGATGGGGGCGGATAAACTCAAACCGCGCAGCTACGCGCCAAGGC
TGCAAAATAGACACGAGCCCGCATCGGTTTGGTGGCGTGGAGTGCTTCTGCACACCAC
ACGGATCAAAATGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGC
AGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCGAATCCCGCGAACCATCGAGAATTGAA
CGCAAGTTGCGCCGAGGCCAGCCGGCCAAGGGCAGCTCCGCTGGGCGTCAAGCGTT
GGTTCGCTCCGTGCTAGCTCCATCCCACCTGACTGGTGTGCATGGAGACGGCCGGATG
TGCAGAGTGGCTCGTCTGCCACGGGTGCGACGGGCTGAAGAGCGGGTGTATCGTCTC
GTTGGCCACGAACAACAAGGGTGGATGAAAATTGTGCCTGTGTTGTATCGTGTGCACAT
ATGAGAAGAGATCATAACCTGCGGATGATCCCAACCAAGCGTTATTCACGGATGGC
GGCTTGAATGCGACCCAGGATGGGCGAGGCC

>20MC_ITS

GGCCTCATCTTCATCGGGGGGCCATGGCGAAGGGGCGGATGAAAACACAAACCGGGCGC
AGTTACGCGCCAAGGGAATATTGAAAAACATGAGCCCTATATTGGGTTTTATGGCATG
GGGTGTTGTTGCACGCCATGCGGTTGACATGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCT
CGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCG
AACCATCGAGAATTTGAACGCAAGTTGCGCCCAGGGCCATCCGGCCAAGGGCACGTCC
GCCTGGGCGTCAAGCGTCGCGTCGCTCCGTGCCAACTCCAACCCACCCAACGGGTGCG
TCGGTCGAGGCCCGGATGTGCAGAGTGGCCCGTCGTGCCCGTCGGTGCGACGGGCTGA
AGAGTGGGTCA TCATCTCATCGGCCACGAACAGCAAGGGGTGGATGAAAGTTGTGCCT
GTGCTGCGTCGTGCCGGCCGAGAAGAGATCATACTTCCAGGTGATCCCAACCCATG
CGCCGTTCCACGGGCGGCGGCTTGAATGCGACCCAGGATGGGCGAGGCCACCCGCC
GAGTTTAAGCATAT