

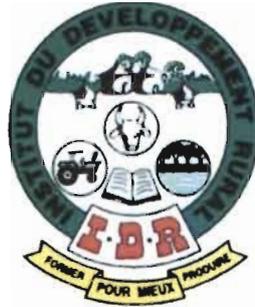
**BURKINA FASO**

Unité-Progrès-Justice

MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE ET SUPERIEUR (MESS)

-----  
UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO (UPB)

-----  
INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

en vue de l'obtention du

**DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES EN GESTION INTEGREE DES  
RESSOURCES NATURELLES  
(DEA/GIRN)**

Option : Système de Production végétale  
Spécialité: Phytopathologie

Thème :

**Evaluation des différentes approches d'amplification de  
l'ADN pour discriminer les souches de *Aspergillus flavus***

Présenté par

**TIENDREBEOGO Assiata**

**Directeur de mémoire : Pr SOMDA Irénée**

**Maitres de stage :**

**Dr BRUNNER Kurt**

**Dr BONKOUNGOU Saidou**

## Table des matières

	Pages
Dédicace.....	iii
Remerciements.....	iv
Sigles et Abréviations.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	viii
Résumé.....	ix
Abstract.....	x
Introduction.....	1
Première partie: Généralités sur <i>Aspergillus flavus</i> et les mycotoxines (Aflatoxines).....	3
1. Généralités sur <i>Aspergillus flavus</i> et les mycotoxines (Aflatoxines).....	4
1.1 <i>Aspergillus flavus</i> .....	4
1.1.2 Classification et caractérisation morphologique de <i>Aspergillus flavus</i> .....	4
1.1.3 Croissance, dissémination et cycle de vie de <i>Aspergillus flavus</i> .....	5
1.1.4 Toxicité et pathogénicité de <i>Aspergillus flavus</i> .....	7
1.1.5 Diversité des populations de <i>Aspergillus flavus</i> .....	7
1.2 Mycotoxines.....	8
1.2.1 Aflatoxines.....	9
1.2.2. Facteurs de croissance des aflatoxines.....	9
1.2.3 Propriétés physico-chimiques et biochimiques des aflatoxines.....	10
1.2.4 Impact des aflatoxines sur la santé humaine et animale.....	10
1.2.5 Incidence économique des aflatoxines.....	11
1.2.6 Rôle des différentes souches de <i>Aspergillus flavus</i> dans la lutte biologique.....	12
1.3 Identification de l'ADN des souches de <i>Aspergillus</i> .....	13
1.3.1 Réaction de polymérisation en chaine ou Polymerase Chain Reaction (PCR).....	14
1.3.2 Procédés d'amplification isotherme.....	16
Deuxième partie: Etude expérimentale.....	19
2. Matériel et méthodes.....	20
2.1 Croissance mycélienne des souches de <i>A. flavus</i> .....	20
2.1.1 Souches de <i>A. flavus</i> .....	20
2.1.2 Culture des différentes souches de <i>Aspergillus flavus</i> obtenues.....	20
2.2.1 Extraction de l'ADN des différentes Souches obtenues.....	21
2.2.2 Détermination de la qualité et de la concentration de l'ADN extrait.....	22
2.3 Réaction d'amplification de l'ADN extrait.....	22

2.3.1 Amplification génomique (PCR).....	22
2.3.2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP).....	24
2.3.3 Réaction d'amplification de la technique RCA.....	26
3. Résultats .....	28
3.1 Culture des souches de <i>A. flavus</i> .....	28
3.2. Extraction d'ADN à partir du mycélium des souches.....	28
3.3 Alignement des séquences et conception des amorces .....	30
3.3.1 Réaction de polymérisation en chaine (PCR).....	30
3.3.2 LAMP (Loop mediated isothermal amplification).....	31
3.3.3 RCA.....	33
4. Discussion .....	34
Conclusion générale et perspectives .....	36
5. Bibliographie.....	38
Annexes.....	x

**Dédicace**

**A ma très chère grande sœur**

**TIENDREBEOGO Zalissa**

**fauchée à la fleur de l'âge.**

**Que la paix d'Allah soit sur elle, et qu'Il lui accorde Sa grâce.**

## Remerciements

Au terme de ces travaux qui ont abouti avec l'aide des personnes de bonne foi et de bonne volonté, nous voudrions à travers ces lignes leur adresser nos remerciements les plus sincères. Qu'il nous soit permis de remercier particulièrement :

**-Dr BONKOUNGOU Saidou**, Chercheur à l'INERA/ Farako-Bâ, coordonnateur national du projet Aflasafe au Burkina Faso, s'est pleinement engagé dans la réalisation du présent document en dépit de ses occupations et des diverses difficultés que nous avons rencontrées. A cet effet nous voulons lui être reconnaissante pour sa grande disponibilité, ses conseils, son suivi, ses encouragements qui ont été pour nous une source de motivation lors du stage;

**-Dr BRUNNER Kurt**, Coordinateur du projet Aflasafe en Autriche, Enseignant chercheur à l'Université Technique de Vienne, chef de l'équipe de biologie moléculaire, notre maître de stage qui nous a proposé le thème, qui a mis à notre disposition les moyens nécessaires pour la réalisation de la présente étude. Nous voulons lui être reconnaissante pour sa grande disponibilité, ses conseils, son suivi, ses encouragements qui ont été pour nous une source de motivation lors du stage et durant tout notre séjour à Vienne.

**-Pr KRSKA Rodolf**, Directeur de l'institut Analytikal Centrum IFA/Tuln et chef du département de biochimie de nous avoir accepté dans son laboratoire

**-Pr SOMDA Irénée**, Enseignant chercheur à l'Université polytechnique de Bobo-Dioulasso, notre directeur de mémoire qui, en dépit de ses lourdes responsabilités, nous a accompagné tout au long de notre stage. Nous voulons lui adresser nos sincères gratitude pour sa disponibilité, ses encouragements et surtout ses conseils qui ont été d'un grand soutien pour nous;

Nous remercions également toute l'équipe de biologie moléculaire:

**-Mademoiselle ZARANIK Céline** notre superviseur qui nous a été d'une aide capitale dans la réalisation de ce présent document.

Ensuite **Eric GONZALES, Vicktoria PREISER, Claudia KOLM, Pauline RIVIERE, Alexandra SMAIDER** pour leurs soutiens multiformes.

-Toute la famille **TIENDREBEOGO** au Burkina Faso et en Côte d'Ivoire pour ses encouragements et aides multiformes;

**-MM KANSANKOGNON Abalou Itolou Raoul** doctorant en phytopathologie, **GUIRE Abdoulaye**, Ingénieur Agronome, **M.TOURE Mahama** Technicien au laboratoire de Phytopathologie de INERA FARAKO-BA pour leur aide multiforme ;

**-Dr SENGHOR Lamine** et son épouse **Mariama SARR** pour leurs soutiens ;

Enfin, nous remercions toute l'équipe Aflasafe: **Dr BANDYOPADHYAY Ranajit**, coordonnateur du projet à IITA-Ibadan, **Dr ATEHNKENG Joseph**, assistant du coordonnateur, pour avoir mis tous les moyens à notre disposition pour la réalisation de notre travail.

## **Sigles et Abréviations**

AAP: Amino Acid Permease

GLCA: Alpha Glucosidase

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique

LAMP: Loop mediated isothermal Amplification

RCA: Rolling Circle Amplification

PCR: Polymerase Chain Reaction

INERA: Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles

DGPSA: Direction Générale des Prévisions et des Statistiques Agricoles

FKR: Farako-Bâ Riz

FAO: Food and Agriculture Organisation (Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture)

AFB: Aflatoxine B

AFG: Aflatoxine G

AFM: Aflatoxine M

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

IITA: Institut International de l'Agriculture Tropicale

SNPs: Single Nucleol Polymorphisms

PDB: Potato Dextrose Broth

PDA: Potato Dextrose Agar

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

CIFR: Center for Integrated Fungal Research

WTO: World Trade Organisation

## Liste des figures

	Pages
Figure 1. A, B: Colonies de <i>A. flavus</i> sur milieu de culture ; C: Image en microscopie électronique des conidies de <i>A. flavus</i> ; D, E: image de microscopie électronique de spores de <i>A. flavus</i> ( <a href="https://www.google.fr/#q=Aspergillus+flavus">https://www.google.fr/#q=Aspergillus flavus</a> ).....	5
Figure 2. Cycle de reproduction de <i>A. flavus</i> . Source:ATSU 2013. ....	5
Figure 3. Cycle de vie de <i>Aspergillus flavus</i> sur maïs, source : Centre intégré de recherche fongique (CIFR), 2005 <a href="http://www.aspergillusflavus.org/aflavus/">http://www.aspergillusflavus.org/aflavus/</a> .....	6
Figure 4. Etapes de la réaction de Polymérisation en chaine, source Lawley, 2007.....	15
Figure 5. Profil type des PCR en temps réel.....	16
Figure 6. Principe de la méthode LAMP .....	17
Figure 7. Détermination du polymorphisme nucléotidique (SNP) (Barreiro <i>et al.</i> , 2008). ....	18
Figure 8. Représentation schématique de la sonde en cadenas et amplification de cercle roulant par deux amorces (Pickering <i>et al.</i> , 2002).....	18
Figure 9:Différentes régions de fixation des amorces et sondes désignées sur les sequences, y compris des SNPs (en rouge).....	31
Figure 10: Oligonucléotides désignés pour la méthode LAMP (soulignées) ainsi que leurs régions de fixation sur les séquences, y compris les SNPs présentés en rouge.....	32
Figure 11. Différentes amorces et sonde Padlock désignées ainsi que leurs régions de fixation (soulignés) sur les séquences, y compris les SNP présentés en rouge.....	33

## Liste des tableaux

	Pages
Tableau.1. Différentes souches de <i>Aspergillus flavus</i> utilisées dans cette étude .....	20
Tableau 2. Différentes séquences des Amorces et les sondes utilisées pour la RT-PCR.....	23
Tableau 3. Composantes et les volumes des mélanges des différents réactifs .....	23
Tableau 4. Programme de la réaction pour la RT-PCR.....	24
Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour les analyses de la méthode LAMP. ....	25
Tableau 6. Composants et les volumes pour les différents Maters Mix utilisés. ....	26
Tableau 7. Programme de la réaction de la méthode LAMP .....	26
Tableau 8. Séquences des amorces et sondes Padlock de la méthode RCA.....	27
Tableau 9. Réactifs et volumes utilisés pour des dosages RCA.....	27
Tableau 10. Souches de <i>Apergillus flavus</i> sur le milieu PDA .....	28
Tableau 11. Concentration d'ADN, ratio A260/A280 et ratio A260/A230 des échantillons extraits.....	29
Tableau 12. Différentes réactions de qPCR basées sur les amorces et sondes désignées.....	30
Tableau 13. Différentes réactions d'amplification de la méthode LAMP des souches de <i>A. flavus</i> testées basées sur les primers et probes désignés. ....	32
Tableau 14. Différentes réactions d'amplifications de la méthode RCA des souches de <i>A. flavus</i> testées basées sur les amorces et Padlock-probe désignés. ....	33

## Résumé

*Aspergillus flavus* est un champignon responsable de certain métabolisme secondaire toxique tel que l'aflatoxine. Il infeste de nombreuses cultures (maïs, riz, sorgho, blé arachide, etc.), des fruits secs, épices, figues, etc. et des produits alimentaires conservés. Il constitue un obstacle majeur à la santé humaine et animale ainsi qu'au commerce des denrées sur le marché international à cause des effets mutagènes, tératogènes et cancérigènes et les immunosuppressions de leurs métabolites secondaires. Les études phylogénétiques précédentes ont conduit à deux critères de description (toxino-gènes et atoxino-gènes). Parmi les diverses mesures entreprises pour lutter contre ce fléau, l'utilisation des souches atoxino-gènes pour lutter contre les souches toxino-gènes (lutte biologique) s'est avérée très effective dans la réduction de la contamination du maïs et de l'arachide par l'aflatoxine.

Aflasafe BF01 est un biofongicide constitué de grains de sorgho préalablement stérilisés et sur lesquels on a cultivé les souches atoxino-gènes de *Aspergillus flavus* natives du Burkina. Pour la lutte biologique, les grains sont ensuite épandus dans les champs d'arachide ou de maïs. Afin de multiplier la population de souche atoxino-gène, il a été nécessaire d'évaluer différentes méthodes d'amplification en utilisant les séquences des gènes AAP (Amino Acid Permease) et GLCA (Alpha Glucosidase) pour différencier les souches de *Aspergillus flavus*. L'extraction de l'ADN a donné suffisamment d'ADN pour toutes les expériences, de fortes concentrations d'ADN (Tox GO97-2 (602 ng/μl), Tox G108-6 (369,17 ng/μl) et Tox M080-4 (191,50 ng/μl)) ont été obtenues, et en général le ratio  $A_{230} / A_{260}$ , se référant à une forte concentration de glucides, était plutôt faible. Bien que les souches Bio M110-7 et Bio M011-8 ont été regroupées en raison de certaines mutations ponctuelles semblables de leurs séquences qui apparaît dans les résultats des analyses PCR pour les oligo n° 4, cette information n'a pas été suffisante pour l'élaboration d'un test spécifique pour la lutte biologique contre les souches toxino-gènes car G097-2 (atoxino-gène) a aussi donné un signal négatif. A travers les résultats obtenus avec les différentes méthodes (LAMP et RCA) nous ne pouvons pas confirmer leurs efficacités quant à la détection des polymorphismes nucléotidiques (SNP). Les séquences utilisées n'ont pas permis de discriminer les souches par les différentes méthodes d'amplifications mais certains oligonucleotides conçus (Oligo n°2 pour la PCR ; N°7 et 8 pour la LAMP et Oligo N°9 et 10 de la RCA) peuvent être utilisés pour détecter uniquement la présence de *Aspergillus Flavus* dans un échantillon.

Mot clé : *Aspergillus flavus*, mycotoxine, souche toxigène, souche atoxigène, PCR, LAMP et RCA

## Abstract

*Aspergillus flavus* is a fungal pathogen and plant pathogen responsible of some metabolisms such as aflatoxin. It infests many crops (maize, rice, sorghum, peanuts, wheat, etc.), dried fruits, spices, figs and food products. It constitutes a serious problem to human and animal health and in commodities trade on the international market because of mutagenic, teratogenic and carcinogenic and immunosuppression of their secondary metabolites. Previous phylogenetic studies have led to two criteria of description (toxigenic and atoxigènes). Among various measures taken to fight this scourge, the use of atoxigènes strains to fight toxigenic strains (biocontrol) has been very effective in reduction of maize and groundnut contamination by aflatoxin.

Aflasafe BF01 is a bio fungicide consisting of sorghum grains previously sterilized and which were contains a mixture of four atoxigenic strains of *A. flavus* native of Burkina Faso. For the biocontrol, the colonized sorghums are then applied on peanut and maize fields. In order to increase the population of atoxigenic strain, it was necessary to evaluate different methods of amplification using gene sequences AAP (Amino Acid permease) and GLCA (Alpha glucosidase) to differentiate strains of *Aspergillus flavus*. DNA extraction yielded enough DNA for all subsequent experiments, high concentrations of DNA (Tox GO97-2 (602 ng/μl) Tox G108-6 (369,17 ng/μl) and Tox M080 -4 (191,50 ng/μl)) were obtained , and in general the  $A_{260}/A_{230}$  ratio, referring to a high concentration of carbohydrates, was rather low. Although the strains Bio M110-7 and Bio M011-8 can be grouped together because of some similar point mutations of their sequences which is shown in the results of the PCR assays for the oligo set No. 4, this information is not sufficient to develop a specific assay for biocontrol strains since the toxigenic G097-2 also gave a negative signal. Through the results got from different methods (LAMP and RCA) we can not confirm their efficacy in the detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs). Unfortunately the sequences used did not provide enough information to discriminate these strains by the different methods of amplification but certain oligonucleotides design in this study (Oligo n°2 from PCR; N°7 & 8 from LAMP and Oligo N°9 & 10 from RCA reaction can be used to detect only *Aspergillus Flavus* in sample.

Keys words: *Aspergillus flavus*, mycotoxin, toxigenic strain, atoxigenic strain, PCR, LAMP and RCA.

## Introduction

Le Maïs (*Zea mays* L.) et l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) sont respectivement originaires du Mexique et d'Amérique du Sud. Ils constituent les principaux aliments couramment utilisés dans le monde en raison de leurs diverses utilisations dans l'alimentation humaine et animale. Ils sont utilisés dans un large éventail d'industries, y compris des usines d'huile, boulangeries, brasseries et certaines industries cosmétiques. Le Burkina Faso est un pays de l'Afrique de l'Ouest dont le secteur primaire est dominé par l'agriculture, employant 80 % de sa population. A cet effet, le maïs et l'arachide jouent un rôle important dans l'alimentation et le commerce dans le pays. La quasi-totalité des productions est consommée dans le pays sous diverses formes: fraîches, cuites, grillées, de pâtes d'arachide, de couscous, ou de farine. Ils apparaissent comme matière première dans les huileries, pâtisseries, brasseries, boulangerie, biscuiterie, industries (cosmétiques, savonneries, etc.) et les tourteaux sont utilisés pour l'alimentation du bétail (Nikiema, 1993; SN, 2010 et Sanou, 2011). La production annuelle du maïs et de l'arachide de la campagne 2012/2013 sont respectivement 1.556.316 tonnes et 310.759 tonnes (DPSA/MAHRA, 2013). Cependant, outre les conditions climatiques peu favorables et la mauvaise qualité des sols cultivés, la pression exercée par les complexes parasitaires (champignons, bactéries, virus, nématodes, phanérogames parasites et insectes) constitue l'une des principales causes entravant le développement de ses cultures (maïs et arachide) au Burkina Faso. En dépit des grandes superficies qu'occupent ces cultures, les rendements demeurent faibles. De nombreuses études ont montré que certains agents fongiques tel que *Aspergillus flavus* infestent les cultures de maïs et d'arachide aussi bien au champ que pendant le stockage en détériorant leurs qualités physiques et sanitaires mais aussi en produisant des métabolites secondaires (Aflatoxines) dont AFB, AFG et AFM qui seraient carcinomes et hépatocellulaires pour l'homme et les animaux (Bayman et Cotty, 1993; Klich, 2002; Cruz et Buttner, 2008). *Aspergillus flavus* est une moisissure, principal agent sécrétant les aflatoxines B1 et B2 (Pitt et Hocking, 1999). Communément rencontré sur les cultures de maïs et d'arachide, *Aspergillus flavus* constitue un obstacle majeur à leur commercialisation sur le marché international en raison de la toxicité élevée de ses métabolites secondaires et leurs effets mutagènes, tératogènes, cancérigènes et immuno suppresseurs (Pitt et Hocking, 1999; Samson *et al.*, 2000; Horn, 2007; Leslie *et al.*, 2008; Mehl et Cotty, 2009). En plus de sa forte présence sur les denrées agricoles, et au vu des multiples usages du maïs et de l'arachide au Burkina Faso, l'ingestion des aliments infestés et

de leurs dérivés peut engendrer des intoxications chroniques et aiguës pour les hommes et les animaux (Pitt et Hocking, 1999 ; Leslie *et al.*, 2008). Cependant, le problème de sécurité alimentaire se pose lorsque se produisent des infections massives de produits agricoles. Au regard de l'augmentation du nombre de victimes recensées chaque année dans le monde et le danger potentiel causé par les métabolites secondaires sur les hommes et les animaux, des mesures judicieuses doivent être prises pour réduire le problème des mycotoxines. Dans les pays développés, la réglementation en vigueur a entraîné une forte réduction du taux d'infection, mais le contrôle total n'est toujours pas atteint à cause de la variabilité génétique au sein des populations de *A. flavus* (souches toxigènes et atoxigènes) et aussi de la production de pectines entre ces isolats qui leur confère une habilité différentielle à utiliser les substrats ainsi que la variation en virulence vis-à-vis des plantes. Par conséquent, le développement de méthodes de contrôle appropriées et durables nécessite une identification précise de ces agents pathogènes et phytopathogènes d'où l'intérêt de notre thème «**Evaluation des différentes approches d'amplification de l'ADN pour discriminer les souches de *Aspergillus flavus***». De nos jours, de nombreuses méthodes ont été établies en biologie moléculaire pour caractériser les variabilités génétiques telles que la **réaction de polymérisation en chaîne** (PCR) ainsi que les séquençages subséquents. Des approches plus sophistiquées peuvent être utilisées comme un simple outil pour l'identification de différentes souches et isolats tel que **l'amplification en cercle roulant** (RCA) et la méthode d'**Amplification isotherme en boucle de médiation** (LAMP). L'objectif principal de cette étude était d'évaluer différentes méthodes d'amplification en utilisant les séquences des gènes AAP (Amino Acid Permease) et GLCA (Alpha Glucosidase) pour différencier les souches de *Aspergillus flavus*.

Le présent document s'articule sur deux grandes parties, dont la première constitue la synthèse bibliographique portant les généralités sur *Aspergillus flavus* et les **mycotoxines** (Aflatoxines) et la deuxième partie consacrée à la partie expérimentale concerne le matériel, les méthodes, les résultats et la discussion des résultats.

**Première partie: Généralités sur *Aspergillus flavus* et les mycotoxines (Aflatoxines)**

# 1. Généralités sur *Aspergillus flavus* et les mycotoxines (Aflatoxines)

## 1.1 *Aspergillus flavus*

### 1.1.2 Classification et caractérisation morphologique de *Aspergillus flavus*

*Aspergillus flavus* est une espèce de champignons (Johann Heinrich Friedrich Link, 1809) qui appartient au sous-règne des ascomycètes, à la classe Eutiomycètes, à l'ordre des Eurotiales, à la famille Trichocomacées, au genre *Aspergillus* et à l'espèce *A. flavus*. Il existe plusieurs espèces de *Aspergillus*: *Aspergillus niger*, *A. ochratus*, *A. parasiticus*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. lucknowensis*, *A. sydowii*, *A. tamaraii*, *A. terreus*, *A. versicolor*, etc. (Kulwant *et al.*, 1991; DFGSM, 2013). La variabilité génétique au sein des souches de *Aspergillus flavus* a fait l'objet de nombreuses études. Les études phylogénétiques précédentes ont conduit à deux critères de description. Selon Cotty (1989), il existe deux groupes morphologiques ("L" et "S") en fonction de la taille du sclérote. Les isolats "L" produisent généralement des sclérotés de grande taille (> 400 µm de diamètre) peu abondants et éparses par opposition aux isolats "S" qui produisent des sclérotés de petite taille (< 400 µm de diamètre) et abondants. Selon Geiser *et al.* (1998), les souches de *A. flavus* ont été organisées en groupe I et groupe II basé sur le RFLP (restriction fragment length polymorphisms) du gène nucléaire codant et la séquence de l'ADN. Le Groupe I contient les souches L et S dont les souches toxigènes produisent seulement l'aflatoxine B et le groupe II contient uniquement les souches S qui produisent les aflatoxines B et G. Les organes de reproduction et de diffusion (conidies) illustrés par la figure 1 sont des petites particules sphériques avec une surface rugueuse de 3 à 5 µm de diamètre. Elles sont formées de stipes rugueux mesurant 400 µm à 1 mm de long et se terminant par une vésicule de 20 à 50 µm de diamètre (Kulwant *et al.*, 1991; Mathur et Kongsdal, 2003; ANSES, 2012). La figure 2 illustre le cycle de reproduction de *Aspergillus flavus*.

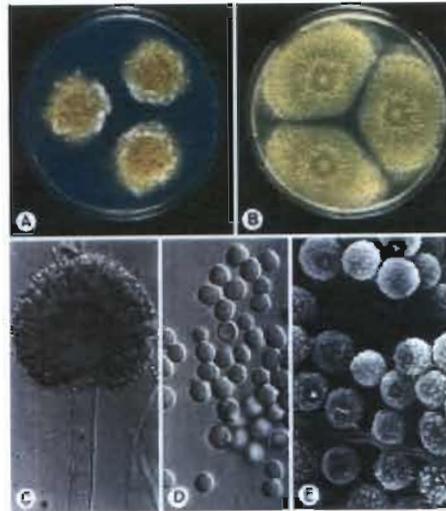


Figure 1. A, B: Colonies de *A. flavus* sur milieu de culture; C: Image en microscopie électronique des conidies de *A. flavus*; D, E: image de microscopie électronique de spores de *A. flavus* ([https://www.google.fr/#q=Aspergillus flavus](https://www.google.fr/#q=Aspergillus+flavus))

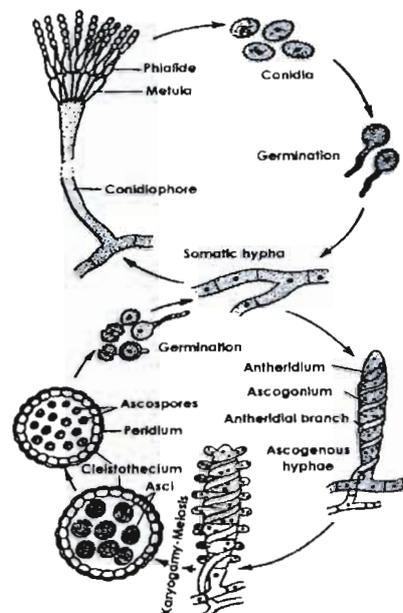


Figure 2. Cycle de reproduction de *A. flavus*. Source: ATSU 2013.

### 1.1.3 Croissance, dissémination et cycle de vie de *Aspergillus flavus*

La distribution de cet agent pathogène s'étend au monde entier mais de préférence dans les zones tropicales et subtropicales. Contrairement à la plupart des champignons, le développement de *Aspergillus flavus* est favorisée par des conditions chaudes et sèches. Sa température optimale de croissance est de 37° C, mais il se développe également à des températures allant de 12 à 48° C. Ces microorganismes sont cosmopolites, capables de coloniser le sol, les débris végétaux et infectent plusieurs cultures comme les céréales (maïs,

riz), arachides, coton, etc. (Inra, 2004 ; Bourais et Amine, 2006). Les conidies sont généralement dispersées dans l'environnement par le vent (l'air, la poussière) et l'eau de pluie mais aussi par les insectes et l'introduction anarchique des semences infectées d'une région à l'autre. Grâce à son pouvoir saprophytique, cet agent pathogène parvient facilement à coloniser les sols, les cultures en pleine croissance, les graines et aussi les aliments lorsque les conditions sont favorables. Le cycle de vie de ce champignon est caractérisé par la colonisation des débris végétaux dans le sol et l'invasion de nouvelles cultures. Les spores de *A. flavus* se conservent dans le sol sous forme de sclérotes ou de mycélium et lorsque les conditions deviennent favorables, ils constituent l'inoculum primaire pour l'infection des graines et des cultures en pleine croissance. Cependant, en raison de la dispersion par le vent et les insectes, les conidies sont conduites sur les sites d'infection ou les blessures causées par des insectes ou des animaux sur les plantes. Après l'étape de l'infection, quand les conditions climatiques deviennent favorables (température, sécheresse et stress élevé), l'agent pathogène se développe davantage et réduit la résistance de l'hôte et les conidies ainsi produites sont les inocula secondaires qui retournent au sol et s'y conservent. La figure 3 illustre le cycle de vie du champignon (*Aspergillus flavus*) sur la culture du maïs (Payne, 1998).

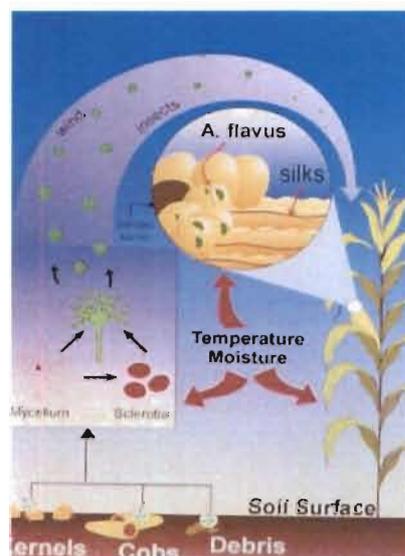


Figure 3. Cycle de vie de *Aspergillus flavus* sur maïs. Source : Centre intégré de recherche fongique (CIFR), 2005 <http://www.aspergillusflavus.org/aflavus/>

#### 1.1.4 Toxicité et pathogénicité de *Aspergillus flavus*

*A. flavus* attire l'attention à cause de sa pathogénicité sur plusieurs espèces végétales et animales, y compris les humains et les animaux domestiques. Ce champignon élabore diverses métabolites toxiques tels que l'aflatoxines B1 et B2, acide aspergillique, acide kojique, acide cyclopi-a-zonique, acide 3-nitropropionique. Il est responsable d'otomycoses (Aspergilloses pulmonaires) et de kératites mycotiques. La sécrétion d'aflatoxines provoque aussi des troubles d'hépatites graves ainsi que de nombreux cancers (Poumon, foie, rate, estomac, colon et reins). Des aflatoxicoses aiguës ou chroniques ont été fréquemment observées en élevage. Les animaux les plus sensibles sont les volailles, les porcins, les jeunes ovins et bovins, ainsi que les truies (Ehrlich, 2006; AFSSA, 2009). En plus de sa toxicité sur la santé humaine et animale, ce champignon a également un effet négatif sur le développement et la croissance des plantes en raison de sa capacité à dégrader et à utiliser les différents substrats et composantes de plante tels que la cellulose, la pectine, la lignine, les tanins, la cutine, l'amidon, les lipides et les protéines (Guo *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1998; Hasan, 1999; Brown *et al.*, 2001; Mellon et Cotty 2004; Batra et Saxena 2005; Horn, 2007). Sa capacité à produire un large éventail d'enzymes dégradantes est révélatrice de son mode de vie opportuniste (Leger *et al.*, 1997). Lorsque le sol ou les semences utilisées sont fortement infestés par ce champignon, la manifestation précoce de la maladie est la baisse de la capacité germinative des semences après la germination, on a les fontes de semis qui se caractérisent par une nécrose du système racinaire et des jeunes tiges, suivie de la mort éventuelle des plantules. Les plantules survivantes présentent une diminution de vigueur et une réduction de résistance à toute situation de stress (Agrios, 1988).

#### 1.1.5 Diversité des populations de *Aspergillus flavus*

Il y a une grande variété de sous espèces de *A. flavus*. Il existe de nombreuses souches et différents Groupes de compatibilité végétative (VCG) (Cotty, 1989; Bayman et Cotty, 1993), mais toutes les souches ne sont pas capables de produire de l'aflatoxine. Certaines souches sont atoxinogènes car elles ne peuvent pas synthétiser l'aflatoxine. Il existe une réelle concurrence avec les souches toxiques lorsque les souches atoxinogènes sont appliquées sur les cultures. Le séquençage de l'ADN a conduit à la caractérisation génétique de plusieurs souches de *Aspergillus flavus*. L'incapacité de certaines souches à produire l'aflatoxine est due à des mutations ou des modifications génétiques au sein du génome. Contrairement à *A. parasiticus*, environ 50 % des souches de *A. flavus* sont productrices d'aflatoxine, mais cela

varie en fonction du substrat initial. La présence de ses deux groupes physiologiques (atoxinogènes et toxinogènes) dans un milieu ou sur un substrat conduit à une compétition exclusive. Parmi les souches atoxinogènes découvertes, la souche AF36 reste l'une des plus efficaces dans la lutte contre les aflatoxines produites par les souches atoxinogènes. Les efforts déployés pour réduire les concentrations d'aflatoxine dans les cultures reposent sur la lutte biologique à l'aide de la souche AF36 non toxinogène (NRRL 18543). Lorsque les souches toxinogènes sont appliquées sur les cultures, elles entrent automatiquement en concurrence avec les souches toxiques pour les ressources.

Généralement, l'application des souches atoxinogènes sur le sol entraîne une réduction importante ou l'élimination des souches toxinogènes. Horn et Dorner (2007) et Wagacha et Muthomi (2008) ont montré une réduction de 77 à 98 % de la contamination par les aflatoxines dans les arachides avec l'application de souches atoxinogènes. De nombreuses études ont confirmé cette efficacité sur certaines cultures telles que les arachides (Cheng, 2007) et le maïs World Trade Organisation (WTO), 1998 ; Atehnkeng *et al.*, 2008).

## **1.2 Mycotoxines**

Le terme mycotoxine vient du grec «mycos» qui signifie champignon et du latin «toxicum» qui signifie poison (Quillien, 2002; Bourais et Amine, 2006). Ce sont des métabolites secondaires ou des substances toxiques dérivées des champignons microscopiques (Principalement *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*). En effet, une seule espèce peut sécréter plusieurs types de mycotoxines et une mycotoxine peut être produite par différentes espèces de champignons. Les mycotoxines ont été découvertes pour la première fois en Grande-Bretagne en 1960 où l'on a assisté à des pertes considérables des dindes suite à des nécroses importantes du foie causées par une famille de mycotoxine, les aflatoxines (Bourais et Amine, 2006). L'agent pathogène infeste les produits végétaux au cours du cycle végétatif ou pendant le stockage des récoltes et produit diverses substances toxiques. Ces métabolites sont de petites molécules, insolubles dans l'eau, stables à l'acidité et à la chaleur et difficilement dégradables par les organismes vivants. Ils sont généralement rencontrés dans un grand nombre de produits alimentaires et leur toxicité dépend des dérivés impliqués, la fréquence de l'exposition et la quantité ingérée (Qayyum, 2002 ; Boiron, 2006 ; Bourais et Amine, 2006). Certaines mycotoxines vont entraîner une intoxication aiguë avec apparition rapide de symptômes (Diarrhée, convulsions, etc.), tandis que d'autres donnent lieu à une toxicité chronique, avec des effets cumulatifs à long terme (cancérogène, hépatotoxique,

hématotoxique, immuno-modulateurs, effets mutagènes, oestrogéniques, neurotoxiques, nécrosantes et néphrotiques) (Qayyum, 2002 ; Boiron, 2006; Brochard et Le Bacle, 2009).

### 1.2.1 Aflatoxines

Diverses mycotoxines ont été découvertes jusqu'à nos jours dont les plus importantes sont les Aflatoxines, les Ochratoxines, les Trichothécènes, les Fumonisines, la Zéaralenone et la Patuline. On les rencontre généralement sur les céréales (Maïs, riz, sorgho, blé, etc.) ou des fruits secs (Cacahuètes, épices, figues, etc.) et sur certains produits (pains, biscuits). Parmi ces métabolites secondaires, les aflatoxines ont été les premières identifiées, les mieux étudiées et les plus réglementées à cause de leurs toxicités et de leurs carcinogénicités à l'homme et aux animaux et aussi à leurs fortes invasions sur les produits agricoles (Bhatnagar *et al.*, 2003). On distingue une vingtaine de groupes d'aflatoxines mais les plus connus sont AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1 (Métabolite de l'aflatoxine B1). L'Aflatoxine B1 est le groupe de composé le plus toxique et le plus prospecté (Boiron, 2006; Brochard et Le Bacle, 2009). Les Aflatoxines ont une grande stabilité thermique et une résistance aux pH extrêmes qui entraînent jusqu'alors une certaine inefficacité des moyens de détoxification. Par conséquent, la présence des aflatoxines dans les denrées alimentaires constitue un risque potentiel du fait de la sévérité et de la diversité de leurs effets sur la santé humaine et animale (Bourais et Amine, 2006).

### 1.2.2. Facteurs de croissance des aflatoxines

Les moisissures productrices des aflatoxines sont très répandues dans le monde et plus précisément dans les pays tropicaux chauds et humides avec 70 à 100 % d'humidité relative (HR). Les Aflatoxines sont synthétisées par trois espèces du genre *Aspergillus*. *Aspergillus flavus* est le principal producteur des aflatoxines du groupe B, *A. parasiticus* et *A. nomius* produisent les aflatoxines du groupe G, en plus des aflatoxines du groupe B et sont très rarement trouvés sur les denrées alimentaires (Pain, biscuits, farine de maïs, etc.) (Navarro, 1993; Bourais et Amine, 2006). En raison de leur pouvoir saprophyte, ce champignon vit dans le sol et infeste les cultures au cours de leur croissance ensuite la contamination devient ainsi importante après la récolte (Pendant le stockage) lorsque les conditions climatiques sont favorables. L'humidité relative (HR), la température et les conditions de stockage sont les principaux facteurs favorisant la croissance des microflore sur les cultures du maïs et de l'arachide. L'interaction combinée de ces facteurs climatiques détermine la vitesse de sporulation des moisissures (Navarro, 1993). Par conséquent, l'infection des produits agricoles par les métabolites secondaires comme les aflatoxines est occasionnée lorsque les

cultures, au cours de leur développement, sont stressées par la chaleur ou la sécheresse ou encore après leur maturation suite à leur exposition à une forte humidité et une forte température avant ou après le stockage. Un degré d'humidité supérieur à 0,7 et une température de l'ordre de 30°C seraient favorables à la production des aflatoxines (Anjaiah *et al.*, 1989 ; Payne, 1992; Bourais et Amine, 2006).

### **1.2.3 Propriétés physico-chimiques et biochimiques des aflatoxines**

Les aflatoxines sont de faibles poids moléculaires et dérivés de difuranocoumarine. L'AFB1 et l'AFB2 ont respectivement 312 et 314 g/mol de masses molaires. Elles sont fluorescentes de couleur bleu sous lumière UV, l'AFG1 et AFG2 sont fluorescentes de couleur verte avec des poids moléculaires respectifs de 328 et 330 g/mol. La masse molaire de l'AFM1 est 328 g/mol. Elle est caractérisée par une inflorescence bleu-mauve. Les aflatoxines sont des molécules peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires et très solubles dans les solvants moyennement polaires tels que le chloroforme et le méthanol (Bourais et Amine, 2006; Handles, 2012).

### **1.2.4 Impact des aflatoxines sur la santé humaine et animale**

Depuis la découverte des aflatoxines, de nombreuses études ont montré qu'elles sont à l'origine de nombreuses maladies, y compris le cancer du foie, l'hépatite chronique, la jaunisse et la cirrhose. Ces mycotoxines sont toxiques lorsqu'elles sont ingérées en grande quantité dans un laps de temps, ou en petites quantités sur une longue période de temps, il s'agit alors de toxicité aiguë et de toxicité chronique respectivement. Une longue exposition (inhalation de spores) à de très faibles doses d'aflatoxines peut également être source de risque pour la santé. En plus de leurs effets cancérigènes et hépatotoxiques, ces mycotoxines n'ont pas seulement un impact sur la croissance et le développement des enfants, mais aussi sur le système immunitaire (Bandyopadhyay et Cardwell, 2001; Qayyum, 2002; Boiron, 2006; Wild, 2007; Atehnkeng *et al.*, 2008; Brochard et Le Bacle, 2009; Handles, 2012).

La diversification de la structure des différents groupes d'aflatoxines explique leur différence de toxicité. L'aflatoxine B1 est la forme la plus toxique de toutes les aflatoxines. La toxicité de l'aflatoxine G1, G2 et B2 est respectivement 50 %, 80 et 90 % inférieure à celle de l'AFB1. Sa génotoxicité est due à l'activation métabolique de l'AFB1 caractérisée par une vie courte mais une haute réactivité. Elle est considérée comme le métabolite principal génotoxique en se liant à l'ADN. On observe deux types d'intoxications: intoxication aiguë et intoxication chronique. La forme chronique est la plus fréquente chez l'homme contrairement à la forme aiguë qui est rarement observée. La forme aiguë est caractérisée par certains symptômes

cliniques typiques, mais non spécifiques incluent la diarrhée, la dépression, l'anorexie et la jaunisse. Des mortalités suite à la consommation du maïs local contaminé par les aflatoxines ont été rapportées en Inde (25 % en 1975) et au Kenya (40 % en 2004).

Le foie est l'organe cible principal en cas de toxicité chronique. Chez les animaux tels que les porcs, les volailles, les poissons d'élevage, les carnivores domestiques, les ruminants etc., les deux types de toxicités sont également observés. Aux USA, l'aflatoxicose a été observée chez les porcs, avec un taux de mortalité élevé suite à une infection des grains de maïs, des grains d'arachide et de sorgho. En cas de toxicité aiguë chez le porc on assiste à une hémorragie qui conduit souvent à la mort. L'intoxication chronique est caractérisée par une perte d'appétit, une asthénie et dans les cas échéant le coma. Chez les volailles et les chiens, la forme chronique est la plus courante et selon la durée d'exposition, on assiste à une altération des paramètres hématologiques et biochimiques et une diminution la croissance du foie (Boiron, 2006; Bourais et Amine, 2006; AFSSA, 2009; Brochard et Le Bacle, 2009; INVS, 2010; Handles, 2011).

#### **1.2.5 Incidence économique des aflatoxines**

A l'instar de ces effets néfastes sur la santé humaine et animale, les aflatoxines ont un impact sur le commerce de plusieurs produits agricoles, les céréales, les oléagineux, les tubercules, les fruits secs et les grains de café qui font la base économique du secteur agricole aussi bien dans les pays développés que dans la plupart des pays africains en voie de développement. Ces impacts sont déterminés par le déclassement ou le retrait sur les marchés internationaux de ces cultures et produits alimentaires.

La FAO estime que 25% des récoltes mondiales sont perdues chaque année en raison de leur contamination par les aflatoxines (George et Cardwell, 2003). Dans les régions agricoles chaudes, de sérieuses pertes en valeurs commerciales des produits agricoles résultant de la contamination des aflatoxines sont observées. Aux USA, la sévérité de l'infection de l'aflatoxine a limité le choix des cultures sur des millions d'hectares et créant ainsi l'abandon même de certaines régions agricoles. Chaque année l'invasion de l'aflatoxine sur les produits agricoles et alimentaires engendre une perte moyenne de 25 millions de dollars sur l'agriculture américaine (George et Cardwell, 2003). Pour les pays en voie de développement comme la plupart des pays africains dont l'économie est basée sur l'agriculture, l'impact est encore plus important. Depuis l'instauration des réglementations strictes sur les normes limites du niveau d'infection de l'aflatoxine sur les produits agricoles et alimentaires, de nombreux pays africains se sont retrouvés en marge du commerce international. Selon la

banque mondiale, le règlement de l'Union Européenne sur l'aflatoxine coûte pour l'Afrique 750 millions de dollars chaque année dans les exportations de céréales, des fruits secs et des noix (Otsuki *et al.*, 2001). Ces normes varient d'un pays à un autre.

Aux USA, le niveau acceptable de l'aflatoxine est de 0,5 ppb dans le lait et 20 ppb dans les aliments transformés (Kensler *et al.*, 2010). Au Canada, 15 à 20 % dans les produits alimentaires transformés, en Europe les normes sont encore plus strictes, la limite tolérable d'aflatoxine est de 4 ppb (Wagacha et Muthomi, 2008). Bien que l'aflatoxine soit très peu réglementé en Afrique, les normes fixées sont entre 10 ppb et 20 ppb. Les règlements ont été présentés dans cinq pays seulement en 2003 et malheureusement, il en reste jusqu'à nos jours de nombreux pays africains, où les règlements n'ont pas été mandatés (Mutegi *et al.*, 2009).

#### 1.2.6 Rôle des différentes souches de *Aspergillus flavus* dans la lutte biologique

Au regard des diverses incidences (Economique, sanitaire et culturelle) causées par cet agent pathogène, de nombreuses méthodes de lutte ont été élaborées, parmi lesquelles nous avons:

La méthode chimique caractérisée par l'utilisation des fongicides, herbicides et des insecticides. Certains composés chimiques et des polymères (Agents liants) ajoutés aux aliments des animaux peuvent neutraliser jusqu'à 90 % des contaminants du maïs lors du traitement pour prévenir les effets nocifs des aflatoxines chez les animaux (Whitlow, 2006).

La méthode culturale basée sur l'utilisation des variétés résistantes aux aflatoxines permet une réduction du taux d'aflatoxine de 82 à 93 % dans le maïs (Khlanguwis *et al.*, 2011). Ensuite l'irrigation, la rotation culturale, l'utilisation des semences saines, le stockage hermétique et le séchage solaire ou le séchage sur la bâche permettent une réduction de la contamination des aflatoxines des produits agricoles.

*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* utilisées en lutte biologique sont souvent associées à d'autres champignons au niveau des gousses et des semences de produits tels que l'arachide, le maïs, les épices, etc. Des hypothèses basées sur de telles observations stipulent que les interactions entre champignons compétissant pour un même substrat peuvent, dans certaines conditions environnementales limiter l'invasion des champignons toxigènes. C'est le cas de l'interaction entre *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* (Mehan *et al.*, 1991; Cline, 2005; Dorner et Horn, 2007) ou entre les souches de *Aspergillus flavus* par l'utilisation de Aflasafe (Atehnkeng *et al.*, 2008). La méthode biologique avec l'utilisation de l'Aflasafe s'avère la plus efficace et la plus utilisée grâce à la diversité génétique existant au sein de ce champignon. Cette diversité génétique est occasionnée par la variation d'une seule paire de bases du génome entre les individus d'une même espèce appelés SNPs. Les SNPs peuvent se

retrouver sur les régions codantes (exon) ou non codantes (intron). Lorsqu'ils apparaissent sur la région non codante, on assiste alors à une mutation ou un polymorphisme d'une ou plusieurs paires de base au sein de la séquence. Le polymorphisme nucléotidique (SNP) est un outil qui permet d'identifier les génotypes à partir d'échantillons de matière organique et de contribuer à la construction d'arbres généalogiques d'êtres vivants ou d'espèces (Campbel et Reece, 2007). De nombreux chercheurs ont montré qu'il y a une compétition exclusive entre les souches atoxinogènes et les souches toxino-gènes de *Aspergillus flavus* quand elles sont dans le même milieu. Aflasafe est utilisé en lutte biologique pour réduire la contamination de l'aflatoxine dans les céréales. Aflasafe (qui veut dire sain vis vis-à-vis de l'aflatoxine) est le nom commercial utilisé par l'IITA. Ce produit biofongicide est basé sur des souches atoxinogènes natives de chaque pays concerné (Pour le Burkina il s'agit de Aflasafe BF01 pour le moment). Le système de cette lutte biologique consiste à utiliser la souche atoxinogène (Par exemple AF36 pour les USA) pour réduire la population des souches responsables de la production d'aflatoxine (Souche toxino-gène) dans un milieu.

Aflasafe est obtenu par l'inoculation de la souche atoxinogène de *Aspergillus flavus* sur les grains de sorgho préalablement stérilisés à 121°C pendant 1 heure, séchés et refroidis. La croissance du champignon est ensuite arrêtée par un étuvage à 50°C pendant 72 heures. Après refroidissement, les grains sont conditionnés dans des emballages et sont prêts pour utilisation.

L'utilisation de Aflasafe consiste à épandre 10 kg de grains par hectare dans les champs d'arachide ou de maïs. Au Burkina Faso, quatre souches indigènes (atoxinogènes) ont été utilisées M109-2; M110-7; MO11-8 et GO18-2 pour la fabrication de Aflasafe.

Des résultats remarquables ont été obtenus avec une réduction supérieure à 90 % de contamination sur le maïs au Nigeria avec l'application de l'aflasafe dans les champs de maïs (Atehnkeng *et al.*, 2008).

### **1.3 Identification de l'ADN des souches de *Aspergillus***

L'identification des micro-organismes peut être basée sur des critères phénotypiques (morphologique, biochimique, physiologique, etc.), moléculaires ou génomiques. Elle repose fortement sur les critères morphologiques (couleur, l'apparence physique du développement des colonies et des détails microscopiques des structures morphologiques) qui exige une grande acuité visuelle (Cotty, 1989; Wang et Zhu, 2008). Selon certaines études, la classification taxonomique des champignons reposait exclusivement sur les caractéristiques

morphologiques (Wang et Zhu, 2008). Cependant, de nos jours, de nombreux chercheurs ont prouvé par des techniques actuelles que cette méthode reste insuffisante pour les études phylogénétiques parce que la plupart des caractéristiques ne sont pas très distinctives au niveau de l'espèce (Tran-Dinh *et al.*, 1999; Ehrlich *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2006; Jutta *et al.*, 2011). Afin de lever toute ambiguïté entre les différentes espèces du champignon, l'identification avec les techniques de la biologie moléculaire est recommandée. Ces méthodes sont principalement basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), mais également sur d'autres techniques d'amplification telles que la technique d'amplification isotherme boucle-négociée (LAMP) et Amplification de cercle roulant (RCA) qui sont plus rapides et facile-à-réaliser et sans la nécessité d'instruments sophistiqués et coûteux comme le thermocycleur (Schweitzer et Kingsmore, 2001).

### **1.3.1 Réaction de polymérisation en chaîne ou Polymerase Chain Reaction (PCR)**

La PCR est une des inventions scientifiques les plus importantes du 20<sup>ème</sup> siècle. Parmi les différentes méthodes de détection, elle reste la technique incontournable et la plus utilisée en biologie moléculaire de nos jours. Grâce aux réactions enzymatiques, cette méthode permet la sélection et l'amplification de petite quantité d'un fragment d'ADN spécifique en grande quantité (Schweitzer et Kingsmore, 2001).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) consiste à 20-40 changements récurrents des niveaux de température (cycles), dans lequel une molécule d'ADN peut être amplifiée exponentiellement voire  $10^9$  exemplaires de la molécule désirée. Un cycle comporte généralement trois étapes: une étape de dénaturation au cours de laquelle, on a la séparation du fragment d'ADN en deux brins distincts sous une température de 95°C. Ensuite, la phase d'hybridation consiste à la reconnaissance et à la fixation des amorces à leurs séquences complémentaires en réformant les liaisons hydrogènes. La température est généralement comprise entre 50°C et 60°C. Au cours de la période d'élongation, la température est réglée à 72°C pour permettre à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. On obtient enfin deux nouveaux fragments identiques au fragment initial qui marque la fin du cycle (figure 4). Pour vérifier si la PCR a généré l'amplicon désiré, les produits de l'amplification peuvent être séparés sur la base de leur taille par l'électrophorèse sur le gel d'agarose et comparés ensuite avec un marqueur de poids moléculaire qui est exécuté le long des produits PCR (Mullis et Faloona, 1987; Schochetman *et al.*, 1988).

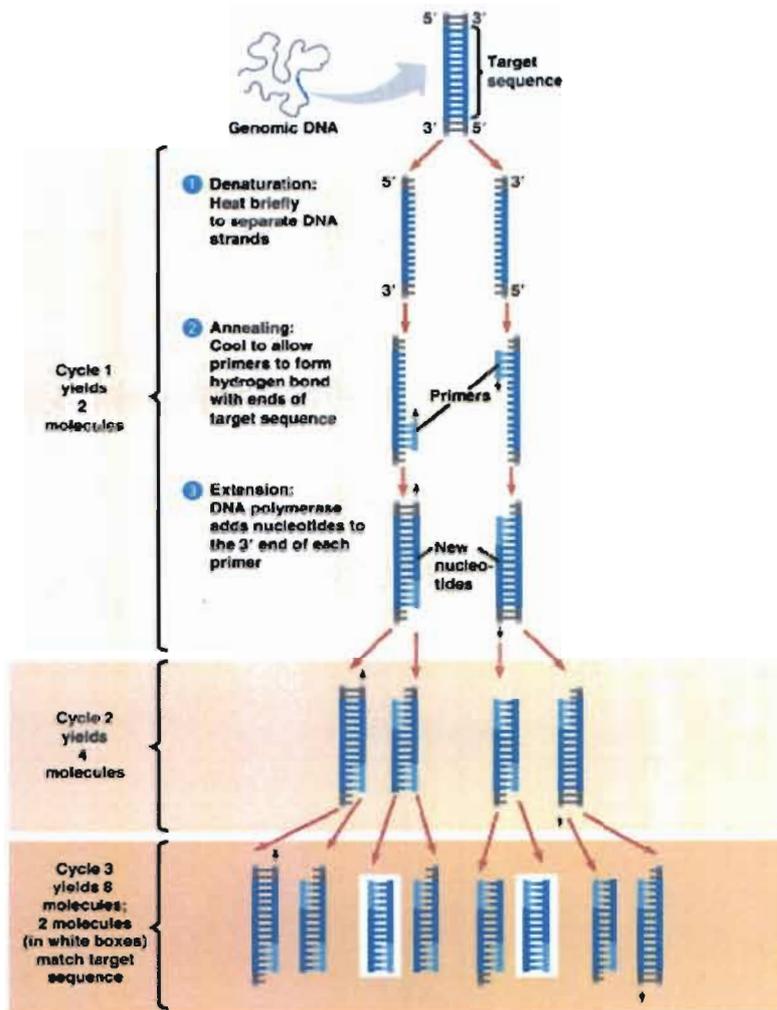


Figure 4. Etapes de la réaction de Polymérisation en chaîne, (Lawley, 2007).

La PCR en temps réel (Real-Time PCR) ou PCR quantitative est une approche plus avancée de la PCR ayant de nombreuses applications. Elle basée sur une réaction enzymologique. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR (Poitras et Houde, 2002). Elle permet de mesurer à chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicon grâce à un marqueur fluorescent (figure 5). L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible. Les deux principales méthodes de détection sont l'utilisation non-spécifique des colorants fluorescents (Intercalating dyes) incorporés dans le double brin d'ADN et aussi l'utilisation des amorces spécifiques ou des sondes portant un reporter fluorescent qui émet seulement la fluorescence après hybridation à l'ADN cible (Poitras et Houde, 2002 ; Wilhelm et Pingoud, 2003).

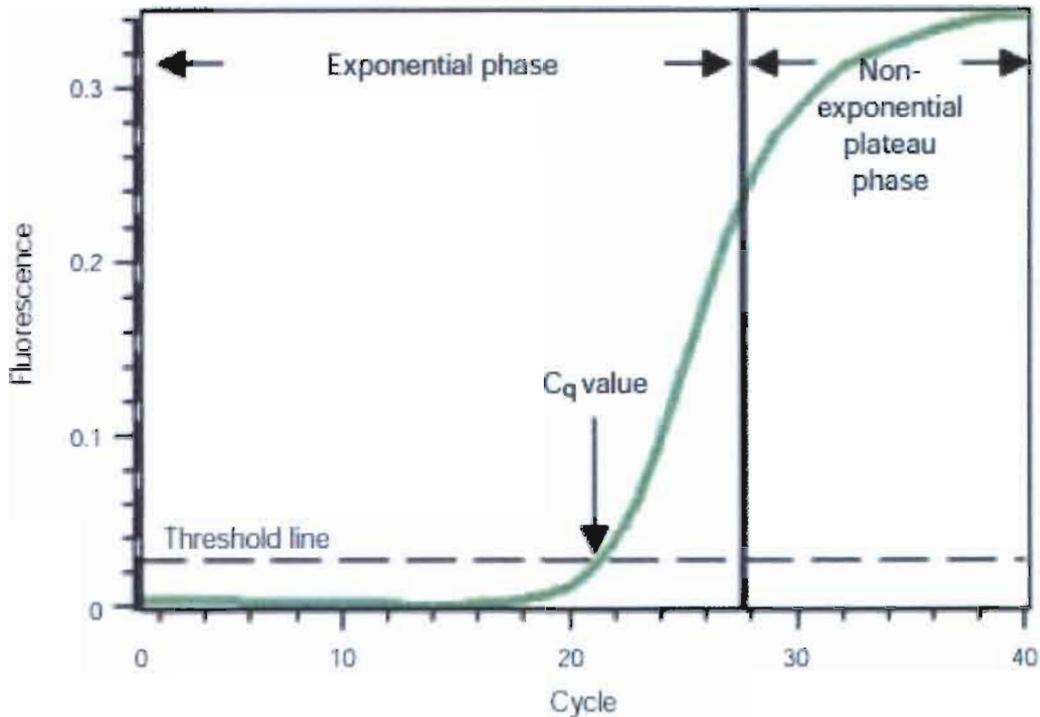


Figure 5.

Profil type des PCR en temps réel

### 1.3.2 Procédés d'amplification isotherme

La découverte de l'ADN polymérase avec l'activité de déplacement de brin a conduit au développement de plusieurs techniques d'amplification des acides nucléiques qui peuvent être effectuées sous des conditions isothermes. L'étape de dénaturation exigée devient obsolète, éliminant ainsi le coût élevé et la maintenance intensive du thermocycleur. En plus, plusieurs réactions d'amplification isotherme peuvent être effectuées du fait de l'invariabilité de la température avec la plaque chauffante.

#### 1.3.2.1 Amplification isotherme boucle-médiation (LAMP)

La LAMP est une technique d'amplification des acides nucléiques (ADN) élaborée par Notomi *et al.* (2000). C'est une technique simple, rapide et moins coûteuse car elle ne nécessite pas de thermocycleur. Dans cette méthode, la séquence cible est amplifiée à une température constante de 60 - 65 ° C à l'aide soit de deux ou trois ensembles d'amorces et une polymérase ayant une activité de déplacement de brin élevé en plus d'une activité de réplication. Typiquement, quatre amorces différentes sont utilisées pour identifier six régions

distinctes sur le gène cible. Ensuite, pour accélérer la réaction, une paire supplémentaire d'« amorces boucle » est utilisée ce qui ajoute à sa spécificité élevée. En raison des conditions isothermes (La température optimale pour la polymérase du Bst est de 65 ° C), la réaction peut être effectuée en moins de 60 minutes, produisant  $10^{10}$  exemplaires du gène cible (Notomi *et al.*, 2000; Nagamine *et al.*, 2002; Iwamoto *et al.*, 2003). Le principe de la méthode LAMP est illustré sur la figure 6.

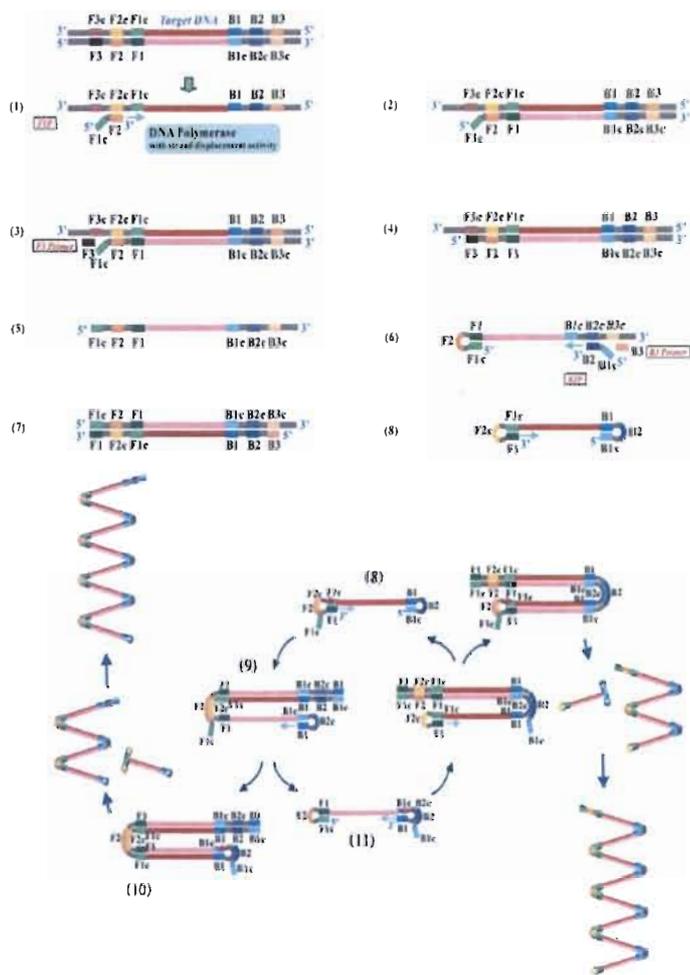


Figure 6. Principe de la méthode LAMP.

(1) à une température de 65° C l'ADN molécule est à un équilibre dynamique des molécules échoués simples et doubles. L'apprêt intérieur avant (FIP) - composé de la région de F2 et F1c - peut être hybridé directement à la région de F2c de la cible. (2) la polymérase synthétise un brin complémentaire, qui est l'abréviation de la région de F3c sur l'extrémité 5'. (3) l'amorce vers l'avant (F3) recuits à la région F3c du brin complémentaire où un nouveau volet est synthétisé et en même temps le brin formé à l'étape (2) est libéré. (4) la région F1c - générée par la FIP - est complémentaire de la région de F1 du PCIM lui-même et forme une structure en forme de dumbell sur l'extrémité 5'. (5) - analogue (7) la même réaction se déroule sur l'extrémité 3' avec l'apprêt intérieur arrière (BIP) et amorce vers l'arrière (B3). (8) le single brin de molécule d'ADN avec les structures de boucle sur les deux la 5' et 3' fin fournit la structure départ pour lampe vélo. (9) - (11) continu auto-amorçantes et libérant des produits formés d'amplification conduisent à la synthèse des différentes tailles des brins d'ADN contenant les cibles d'ADN alternativement inversées.

### 1.3.2.2 Amplification de cercle roulant (RCA)

Rolling circle amplification (RCA) est une autre technique isotherme appelée **Amplification de cercle roulant**, développée à l'origine par Fire et Xu (1995) et modifiée plus tard par Lizardi *et al.* (1998). Ces auteurs ont proposé cette approche intéressante en raison de sa très grande efficacité pour la détection de la variation (Polymorphisme) d'une seule paire de bases du génome, entre les individus d'une même espèce (Polymorphismes d'un seul nucléotide ou SNPs illustrés par la figure 7). Cette technique est caractérisée par l'utilisation d'une sonde en forme de cercle ouvert (Padlock-probe) constituée de deux régions complémentaires à

l'ADN cible en position juxtaposée aux extrémités 3' et 5'. La sonde est ensuite circularisée à l'aide d'un ligament ajouté lors de la réaction. Le cercle de l'ADN étant fermé, le processus d'amplification démarre par l'hybridation d'un ou plusieurs amorces produisant ainsi un long brin d'ADN résultant de nombreuses répétitions de la séquence cible. La figure 8 présente la réaction d'amplification en cercle roulant (Pickering *et al.*, 2002).

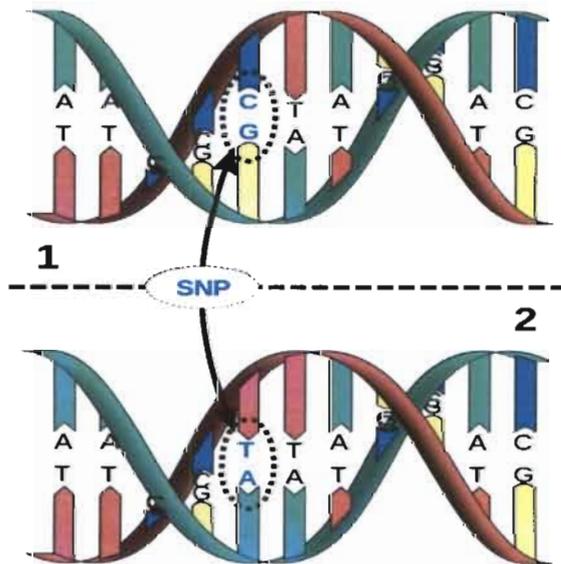


Figure 7. Détermination du polymorphisme nucléotidique (SNP) (Barreiro *et al.*, 2008).

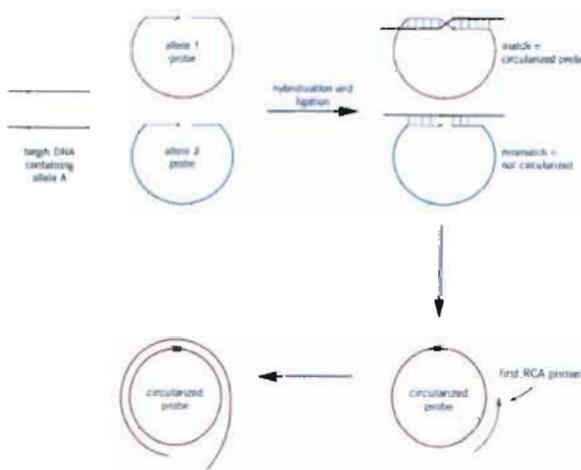


Figure 8. Représentation schématique de la sonde en cadenas et amplification de cercle roulant par deux amorces (Pickering *et al.*, 2002).

## Deuxième partie: **Etude expérimentale**

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Croissance mycélienne des souches de *A. flavus*

#### 2.1.1 Souches de *A. flavus*

Vingt-deux (22) souches de *Aspergillus flavus* ont été utilisées comme matériel biologique dans cette étude. Les échantillons de maïs et d'arachide ont été prélevés dans différentes zones agro-écologiques du Burkina Faso. Ils ont été conditionnés dans des sacs de polyéthylène stériles séparés et amenés au laboratoire. Toutes les souches ont été isolées à l'Institut International d'Agriculture Tropicale au Nigéria (IITA) à partir des échantillons collectés au Burkina Faso. Le tableau 1 illustre les différentes souches obtenues (Souches toxigènes, souches atoxinogènes et souches utilisées pour la lutte biologique).

**Tableau.1. Différentes souches de *Aspergillus flavus* utilisées dans cette étude**

Type de souches	Origine	Souche
Souches atoxinogènes	Lutte biologique	M109-2 ; M110-7 ; MO11-8 ; GO18-2
	Écologie naturelle	SGO95-3 ; SMO50-13 ; SG115-4 ; SGO53-12 ; M106-7
Souches toxigènes	Écologie naturelle	GO51-15 ; SMO85-5 ; M121-11 ; MO03-1 ; SGO26-8 ; MO80-4 ; SGO10-3 ; SMO21-14 ; G108-6 ; SMO27-7 ; SMO98-13 ; GO97-2 ; GOO4-3

#### 2.1.2 Culture des différentes souches de *Aspergillus flavus* obtenues

La préparation de champignons pour l'extraction d'ADN implique leur mise en culture sur milieu spécifique et pour cela, dans notre cas deux milieux ont été utilisés (PDA (Potato dextrose agar) et PDB (Potato Dextrose Broth)). Premièrement, toutes les souches du champignon ont été cultivées sur le milieu PDA, puis les mycéliums de chacune de ces souches ont été transférés dans le milieu liquide (PDB) afin d'éviter toute interférence avec le milieu gélosé qui peut compliquer l'extraction de l'ADN.

### **2.1.2.1 Culture sur milieu solide PDA**

Trente-neuf (39) g de PDA (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Allemagne) ont été dissous dans 1 l d'eau distillée, autoclavée à 121° C pendant 30 minutes, puis 25 ml ont été transférés dans des boîtes de Petri dans des conditions aseptiques pour éviter toute contamination. Lorsque le milieu s'est solidifié, les souches ont été inoculées et puis incubées à 30°C. Après une semaine, les conidies de chaque souche ont été récoltées puis dissous dans une solution de 40 % de glycérine dans les tubes de 2 ml et stockées à -20°C pour les utilisations ultérieures.

### **2.1.2.2 Culture du champignon sur milieu liquide PDB**

La préparation de ce milieu consiste à dissoudre 2,4 g de PDB (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Allemagne) dans 100 ml d'eau contenu dans un erlenmeyer ou fiole. Les fioles ont ensuite été stérilisées à l'autoclave à 121° C pendant 30 minutes. Après refroidissement à la température ambiante, les milieux ont été inoculés avec 40 µl de la solution de conidies (Conidies conservées dans de la glycérine 40 %) de chaque souche de *Aspergillus* puis incubés pendant trois jours dans un agitateur à 30° C à 700 tr/min.

## **2.2.1 Extraction de l'ADN des différentes Souches obtenues**

Tous les échantillons d'ADN des souches de *Aspergillus flavus* utilisés dans cette étude ont été obtenus suivant le protocole d'extraction de phénol-chloroforme. Les mycéliums cultivés ont été filtrés et homogénéisés par ajout d'azote liquide et le broyage en poudre fine à l'aide d'un mortier et un pilon. Les poudres ainsi obtenues ont été ensuite transférées dans un tube de 2 ml et 600 µl de la solution tampon d'extraction (CTAB solution) a été ajoutée. Le mélange est agité et incubé à 65° C pendant 15 minutes. Puis 450 µl de phénol et 450 µl de chloroforme : alcool isoamyl (49: 1) ont été ajoutés aux échantillons et mélangés délicatement jusqu'à ce que la solution devienne laiteuse. Les tubes ont été ensuite centrifugés à la température ambiante (25°C) à 13000 g pendant 5 minutes. Après cette étape de centrifugation, le surnageant a été transféré dans un nouveau tube de 2 ml et de 400 µL de chloroforme: isoamyl-alcool a été ajouté. Le nouveau mélange a été centrifugé à nouveau à 13000 g à la température ambiante pendant 2 minutes. Le surnageant ainsi obtenu a été ensuite transféré dans des tubes de 1,5 ml et 0,7 volume d'isopropanol ont été ajoutés afin de précipiter l'ADN, puis les tubes ont été ensuite centrifugés à 13000 g pendant 20 minutes à température

ambiante. Après cette centrifugation, le liquide a été versé et les pellets ont été rincés deux fois successivement avec 500 µl d'éthanol à 96 % et centrifugés pendant 3 minutes pour éliminer l'éthanol excessif. Les pellets ont été séchés sous vacuum pendant 30 minutes et dissous dans 50 µl de 10 mM Tris (pH 8) ensuite incubés à 65° C pendant 30 minutes dans le thermocycleur.

### **2.2.2 Détermination de la qualité et de la concentration de l'ADN extrait**

La concentration et la qualité de l'ADN ont été mesurées avec le spectrophotomètre NanoVue Plus (VWR, Radnor, USA). Le processus consiste à nettoyer d'abord le détecteur avec un tissu fin et déposer 2 µL de Tris à pH 8 (10 mM) à l'aide d'une micropipette sur le détecteur du NanoVue afin de soustraire la concentration de la solution tampon. Cette solution tampon (Tris à pH 8 (10 mM)) doit être identique à celle utilisée pour suspendre à nouveau l'ADN après l'extraction. Ensuite on procède au pipetage de 2 µL de chaque échantillon directement sur le détecteur pour déterminer leurs concentrations. Les échantillons sont ainsi considérés purs si le rapport entre ADN/ hydrate de carbone est supérieur ou égal à 2 ou supérieur ou égal à 1,8 pour le rapport ADN/ Proteine. Après avoir vérifié la concentration de l'ADN extrait ainsi que leur pureté, tous les échantillons ont été dilués à 01:10 et stockés (échantillons initiaux et dilués) au congélateur à - 4° C pour une utilisation ultérieure.

## **2.3 Réaction d'amplification de l'ADN extrait**

### **2.3.1 Amplification génomique (PCR)**

Les amorces et les sondes ont été conçues en utilisant le logiciel de conception en ligne Primer3Plus ([www.bioinformatics.nl/primer3plus](http://www.bioinformatics.nl/primer3plus)) et synthétisées par Eurofins MWG, Ebersber, Allemagne. Selon le protocole fourni par la compagnie Eurofins, 10 mM de Tris a été ajouté à tous les oligonucléotides afin de les lyophiliser et ensuite les incuber à 65°C pendant 15 minutes. Après l'incubation, une dilution 01:16 (des oligonucléotides) a été effectuée et conservés à -20°C. Toutes les séquences des amorces et sondes utilisées sont mentionnées dans le tableau 2.

**Tableau 2. Différentes séquences des amorces et les sondes utilisées pour la RT-PCR**

Oligo N°.	Gène ciblé	Souches	Description	Sequence 5' > 3'
1	AAP	M110-7	Amorce 1	TGCTGCGGTCCATGTAG
			Amorce 2	GGCTCGACTGTTAGCAGATA
			Sonde	FAM-AGTTTGCCATTGAATAGACA-BHQ1
2	AAP	M110-7	Amorce 1	GTCCATGTAGGGTCAACTGTGT
			Amorce 2	GGCTCGACTGTTAGCAGATA
3	GLCA	M110-7	Amorce 1	TGATGTTTCTAGATAGTCCAAATGC
			Amorce 2	TTGATGGTAACATTACTGTATGTGC
4	GLCA	M092-15	Amorce 1	TGCTGCGGTCCATGTAT
			Amorce 2	GGCTCGACTGTTAGCAGATC
			Sonde	FAM-TGCCTTTAAATAGCCCCA-BHQ1

Toutes les réactions ont été effectuées à l'aide du thermocycleur Eppendorf Realplex (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Les mélanges ont été préparés dans des conditions aseptiques pour éviter la contamination des réactifs. Toutes les souches de *A. flavus* ont été amplifiées en trois répétitions, y compris le contrôle négatif (NTC). Le tableau 3 présente les composantes des deux mélanges utilisés.

**Tableau 3. Composantes et les volumes des mélanges des différents réactifs**

Detection via FAM	Volume (µl/puit)	Detection via SYBR	Volume (µl/puit)
Sonde Kapa	7,5	Kapa Sybr	7,5
Amorce 1 (fw primer)	0,24	Amorce 1 (fw primer)	0,24
Amorce 2 (rev primer)	0,24	Amorce 2 (rev primer)	0,24
Sonde	0,24	Sonde	-
PCR grade water	4,78	PCR grade water	5,02
DNA (Template)	2	DNA (Template)	2
Volume total	15	Volume total	15

Pour établir la température d'hybridation optimale pour les amorces utilisées, une PCR de gradient de température (52-62° C pour l'étape d'hybridation des amorces) a été réalisée. Le programme de la réaction est donné dans le tableau 4.

**Tableau 4. Programme de la réaction pour la RT-PCR**

Étapes	Température	Durée	Nombre de cycles
Initialisation	95°C	2 min	
Étape 1	95°C	15 sec	45x
Étape 2	53°C	1 min	

### 2.3.2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Les amorces de la méthode LAMP ont été conçues en utilisant le logiciel Primer Explorer V4 (<https://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/>) créé par Eiken Chemical CO., Ltd. (Tokyo, Japon) et synthétisée par Eurofins MWG. Tous les oligo-nucléotides ont été incubés avec 10 mM Tris selon la quantité indiquée sur le protocole d'utilisation à 65°C pendant 15 minutes. A l'exception de la FIP et le BIP, toutes les amorces désignées ont été diluées au 01:10 pour une utilisation ultérieure. Les séquences des amorces ainsi désignées sont présentées dans le tableau 5.

**Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour les analyses de la méthode LAMP.**

OligoNo.	Gène	Souches	Description	Séquences 5' > 3'
5	AAP	M110-7	FIP	ATGGACCGCAGCATCACCGCCAGCG- AGGCGCTGTCAGTCTTTG
			BIP	CAACTGTGTCTATTCAATGGCA- CGGTTGTTGCATTGGTCATC
			F3	GAGGGAAATTGGCCTTCGA
			B3	GCATCAGAGACAGGGGAAC
			LoopF	AGGGCCAGTCAACCCGA
			LoopB	ATCTGCTAACAGTCGAGCCATAG
6	AAP	M092-15	FIP	ATACATGGACCGCAGCATCACCGCCAGGCGCTGTCAG TCTTTG
			BIP	TGGGGCTATTTAAAGGCAAACGCGGTTGTTGCATTGG TCATC
			F3	GAGGGAAATTGGCCTTCGA
			B3	CATCAGAGACAGCGGAACAG
			LoopF	AGGGCCAGTCAACCCGA
			LoopB	ATCTGCTAACAGTCGAGCCATAG
7	AAP	M110-7	FIP	ACAGTTGACCTACATGGACCGGGCCCTGTTTTTGCTT TC
			BIP	TGTCTATTCAATGGCAAACCTATCTGCTAACTCTCTTC GACCATCTATGGCTC
			F3	TGTCAGTCTTTGTCGGGTTGACT
			B3	AGCGGTTGTTGCATTGGTCA
8	GLCA	M110-7	FIP	TCAGCTCCAACCCTGGCATTCTGTAATGCCATTTGAA TCGTTTG
			BIP	ATGGGGGAAAACCTCTAAATCAGTTCCTTGATGGAACA TTACTGTATGT
			F3	CGACCGATGGTACAATTG
			B3	CTTTGGCCGACCGAAA

Les réactions ont été effectuées à l'aide du thermocycleur Realplex Eppendorf (Hambourg, Allemagne). Contrairement à la RT-PCR, le volume total du Master Mix est de 25 µl pour chaque répétition. Les composantes utilisées sont illustrées dans le tableau 6. Le Master Mix de cette technique (LAMP) est constitué par 1,4 µM de dNTP (Peqlab, Erlangen, Allemagne),

solution de bétaïne de 0,8 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 8 U Bst ADN polymérase (New England Biolabs, Ipswich, USA), 20mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM de KCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1 µL Syto ® 9 vert fluorescent colorant Acide Nucléique (Life Technologies Carlsbad, États-Unis). Toutes les réactions ont été analysées en trois répétitions, y compris le contrôle négatif. Le programme de la température est donné dans le tableau 7.

**Tableau 6. Composants et volumes pour les différents Masters Mix utilisés**

Master mix 1	Volume µl/puits	Master mix 2	Volume µl/puits
FIP	0,5	F3	7,5
BIP	0,5	B3	0,24
F3	0,4	FIP	0,24
B3	0,4	BIP	5,02
LoopF	2	H2O	4
LoopB	2		
Lamp mix	17,2	Lamp mix	17,2
DNA (Template)	2	DNA (Template)	2
Total (échantillon + MM)	25	Total (échantillon + MM)	25

**Tableau 7. Programme de la réaction de la méthode LAMP**

Etape de la reaction	Temperature	Durée	Nombre de cycles
Amplification	65°C	1 mn	60
chauffage	80°C	10 mn	-

### 2.3.3 Réaction d'amplification de la technique RCA

La réaction de RCA est divisée en deux étapes : la réaction de ligature et la réaction d'amplification. Les séquences des amorces et sondes 'Padlock-probe' conçues sont présentés dans le tableau 8. Les réactifs et leurs volumes sont indiqués dans le tableau 9. Pour la réaction de ligature, la sonde Padlock doit porter un groupement phosphate à l'extrémité 5'. En outre, cette réaction est effectuée sur une plaque chauffante (Eppendorf, Hambourg, Allemagne), la réaction d'amplification est effectuée sur le thermocycleur de Realplex Eppendorf.

**Tableau 8. Séquences des amorces et sondes Padlock de la méthode RCA**

N°. Oligo	Gène cible	Souches	Description	Séquence 5'→ 3'
9	GLCA	M110-7	Sonde padlock	[Phos]CAGCTCCAACCCTGGTTTGATGCCGTATGCC TAGCACGGAATTAAGTTGCTAGCCGTCCAGGTTTT TCCCCCAT
			Amorce 1	TGCTAGGCATACGGCATCAAA
			Amorce 2	AACTTGCTAGCCGTCCAGGTT
10	AAP	M110-7	Sonde padlock	[Phos]TTGAATAGACACAGTTGACCTTTGATGCCGT ATGCCTAGCACGGAATTAAGTTGCTAGCCGTCCA GGTTAGATAGTTTGCCA
			primer 1	TGCTAGGCATACGGCATCAAA
			primer 2	AACTTGCTAGCCGTCCAGGTT

La réaction de ligature s'effectue en incubant le master mix et l'ADN à 95° C pendant 3 min sans Ampligase, qui sera ajouté par la suite, puis incubé pendant 60 min à 65° C. La réaction d'amplification se fait en ajoutant 20 µl du mix d'amplification au 10µL du produit de la réaction de ligature. Le Master mix de la technique RCA est constitué du mélange suivant: 400 µM dNTP, 8 U Bst polymérase (Grand fragment), 1 µM de chacune des deux amorces et 1 X Thermopol tampon contenant 20 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM de KCl, 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> et 0,1 % Triton X-100 et 1 X Syto ® 9. Les réactifs ont été incubés à 60-65°C pendant 60 min.

**Tableau 9. Réactifs et volumes utilisés pour des dosages RCA**

reaction Ligation	Volume (µl/puit)
Tampon de ligation (1X)	7
Sonde Padlock	2
Produit PCR	1
Ampligase	1
<b>Melange de la réaction RCA</b>	
Tampon des réactifs	21
Amorce RCA1	1
Amorce RCA2	1
Echantillon (produit de la réaction de ligation)	2

### 3. Résultats

Le but de cette étude a été l'évaluation de la différenciation entre les souches de *Aspergillus flavus* productrices d'aflatoxines et les souches non productrices d'aflatoxines. Cette différenciation est basée sur les méthodes de détection des acides nucléiques afin de réduire la production d'aflatoxines dans les produits agricoles particulièrement dans le maïs et l'arachide. Le développement d'un test d'amplification isotherme tel que la LAMP et le RCA, faciliterait en outre l'exécution de ces essais en raison de sa simplicité et la possibilité d'effectuer les essais sans un thermocycleur.

#### 3.1 Culture des souches de *A. flavus*

Toutes les 22 souches cultivées ne se sont pas développées avec succès sur les milieux de culture utilisés. Seulement 10 souches se sont développées sur le milieu PDA et ont été transférées ensuite sur les milieux liquides PDB. Selon le tableau 10, toutes les quatre souches utilisées dans la lutte biologique et apportées dans les milieux se sont développées avec succès ensuite deux souches atoxinogènes et 4 souches toxigènes existant naturellement dans les différentes zones agro-écologiques du Burkina Faso.

**Tableau 10. Souches de *Aspergillus flavus* sur le milieu PDA**

Toxicity	Origine	Souches obtenues
Souches atoxinogènes	Biocontrôle	M109-2, M110-7, MO11-8, GO18-2
	Ecologie naturelle	SG115-4, M106-7
Souches toxigènes	Ecologie naturelle	MO80-4, G108-6, SMO98-13, GO97-2

#### 3.2. Extraction d'ADN à partir du mycélium des souches

Toutes les souches cultivées ont été extraites à l'aide du protocole de phénol-chloroforme décrit selon le point 2.2.1. Ensuite la concentration et la pureté de l'ADN ont été mesurées avec le spectrophotomètre 'NanoVue Plus' des acides nucléiques (tableau 11). Tous les isolats ont donné une quantité d'ADN suffisante permettant de réaliser les expériences ultérieures, bien que le ratio de 260/230 plutôt basse, soit un indicateur de haute quantité

d'hydrates de carbone qui peuvent agir en tant qu'inhibiteurs dans les réactions d'amplification.

**Tableau 11. Concentration d'ADN, ratio A260/A280 et ratio A260/A230 des échantillons extraits.**

Echantillons	DNA concentration ng/μl	Ratio A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	Ratio A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
Bio M109-2	149,75	1,67	0,55
Bio G018-2	166,50	1,69	0,58
Bio M011-8	289,50	1,85	1,04
Bio M110-7	182,67	1,81	0,62
Atox M106-7	153,00	1,68	0,53
Atox SG115-4	124,33	1,58	0,54
Tox SM098-13	100,83	1,66	0,44
Tox GO97-2	602,00	1,91	0,62
Tox G108-6	369,17	1,72	1,04
Tox M080-4	191,50	1,65	0,77

Bio= souche non productrice d'aflatoxine utilisée dans la lutte biologique; Tox= souche productrice de l'aflatoxine; Atox= souche non productrice de l'aflatoxine rencontrée sur les échantillons de maïs et d'arachides au Burkina.

A travers le tableau 11, nous constatons que toutes les souches du champignon présentent une concentration de 100 ng/μl à 600 ng/μl. Les plus fortes concentrations sont obtenues avec les souches productrices d'aflatoxines Tox GO97-2 (602 ng/μl), Tox G108-6 (369,17 ng/μl) et Tox M080-4 (191,50 ng/μl), les souches biologiques Bio M011-8 (289,50 ng/μl), Bio M110-7 (182,67 ng/μl) et Bio G018-2 (166,50 ng/μl) ainsi que la souche non productrice d'aflatoxine Atox M106-7 avec une concentration de 153,00 ng/μl. Cependant, les isolats qui présentent les plus faibles concentrations sont Tox SM098-13 et Atox SG115-4 avec les concentrations respectives 100,83ng/μl et 124,33ng/μl.

La détermination de la concentration de l'ADN après l'extraction avec le spectrophotomètre a permis d'avoir une information sur la qualité de cet matériel génétique. La pureté de ce matériel joue un rôle très important dans sa caractérisation. Le tableau 11 nous met en exergue la qualité de l'ADN extrait des différents isolats utilisés à travers leurs différents ratios d'absorption en protéines (A260/280) ou en hydrates de carbone (A260/230) obtenus. Selon ce tableau, les isolats Tox GO97-2 (1,91), Bio M011-8 (1,85) et Bio M110-7 (1,81) présentent des ratios sensiblement supérieurs ou égaux à 1,8 (protéine) et contrairement à l'absorption en hydrate de carbone, tous les isolats présentent un ratio inférieur à 2.

### 3.3 Alignement des séquences et conception des amorces

Pour identifier les caractéristiques génétiques du gène AAP et GLCA, 28 séquences des souches de *A. flavus* isolées en Afrique de l'Ouest y compris quatre souches utilisées dans la lutte biologique, ont été alignées en utilisant le logiciel Clustal X. Une séparation en deux ou trois groupes a été observée, avec l'une des souches biologiques (M110-7) montrant uniquement une seule base de mutation. Ces différentes séparations pourraient être utilisées pour la conception des tests spécifiques qui ne pourront détecter exactement que ces souches (voir les alignements en annexe). A partir de l'alignement, les séquences présentant un ou plusieurs points uniques de mutations ont été utilisées pour la conception des amorces et des sondes des différents tests d'amplification.

#### 3.3.1 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Tous les oligonucléotides déterminés pour les différentes réactions de PCR ont été conçus pour accomplir un but spécifique: les produits PCR des tests effectués au préalable avec le SYBR green ont été utilisés pour les réactions ultérieures de RCA qui est généralement utilisé pour la détection des SNPs. Les tests avec le Kapa Probe ont été utilisés également pour déterminer une différenciation entre les souches toxigènes et non-toxigènes. Les résultats de l'ensemble des oligonucléotides (amorces et sondes) figurent sur le tableau 12. Dans le tableau 12, nous constatons que la majorité des souches ont présenté un signal à l'exception de la souche **Tox SM098-13 (réactions 1 et 3)**. Les souches **Bio M011-8, Bio M110-7** et **Tox G097-2** ne présentent pas de signal. Cependant, la figure 9 illustre les différentes régions de fixation des amorces et sondes désignés à partir des séquences ciblées.

**Tableau 12. Résultat de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

oligo	Bio	Bio	Bio	Bio	Atox	Atox	Tox	Tox	Tox	Tox
No.#	M109-2	G018-2	M011-8	M110-7	M106-7	SG115-4	SM098-13	G097-2	G108-6	M080-4
1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+

Bio= souche non productrice d'aflatoxine utilisée dans la lutte biologique; Tox= souche productrice de l'aflatoxine; Atox= souche non productrice de l'aflatoxine rencontré sur les échantillons de maïs et d'arachides au Burkina. + signalet -pas de signal

oligo No.1

5'-

TGCTGCGGTCCATGTATTGTCAACTGGGGCTATTTAAAGGCAAACGATCTGCTAACAGTCGAGCCATAGATGGTCG  
AAGAG-3'

oligo No.2

5'-

TGCTGCGGTCCATGTATTGTCAACTGGGGCTATTTAAAGGCAAACGATCTGCTAACAGTCGAGCCATAGATGGTCG  
AAGAG-3'

oligo No.3

5'-

CGTTTGTGATGTTTCTAGATAGTCCAAATGCCAGGGTTGGAGCTGATGGGGGAAACTCTAAATCAGTTCAACAT  
TCTCAAATGTTAGCACATACAGTA-3'

oligo No.4

5'-

TGCTGCGGTCCATGTATTGTCAACTGGGGCTATTTAAAGGCAAACGATCTGCTAACAGTCGAGCCATAGATGGTCG  
AAGAG-3'

Figure 9: Différentes régions de fixation des amorces et sondes désignées sur les sequences, y compris des SNPs (en rouge).

### 3.3.2 LAMP (Loop mediated isothermal amplification)

Les résultats des différentes réactions d'amplification pour la méthode LAMP basés sur les différentes amorces et sondes désignées sont indiqués dans le tableau 13. En effet, ce tableau nous indique qu'il n'y a pas eu de différence significative entre les souches toxigènes et atoxigènes. Après les réactions d'amplifications dirigées par les différents oligonucléotides désignés pour cette méthode, on constate que toutes les souches testées ont présenté un signal (+) lors des réactions dirigées avec les oligonucléotides n°7 et 8 et contrairement à la réaction avec les amorces n°5, les souches Bio G018-2 et Tox G097-2 ainsi que les souches Bio M109-2 et Tox SM098-13 (Les amorces n°6) n'ont pas présenté de signal (-). Les oligonucléotides désignés pour chaque réaction d'amplification ainsi que leurs régions de fixations sur les séquences sont présentés sur la figure 10.

### 3.3.3 RCA

Le tableau 14 présente les résultats des tests de la méthode RCA. En effet, pour cette technique, deux réactions ont été effectuées avec différents oligonucléotides (n°9 et 10). Selon le tableau 14, il n'y a pas de différence spécifique entre les différentes souches (toxigènes et atoxigènes) utilisées. Après les réactions d'amplifications effectuées, un signal positif (+) a été obtenu pour chaque échantillon (souches). Les différents oligonucléotides (primers et Padlock-probe) désignés pour cette méthode ainsi que leurs régions de fixation sur les séquences sont indiqués sur la figure 11.

**Tableau 14. Résultat des Réactions de RCA**

oligo No.#	Bio M109-2	Bio G018-2	Bio M011-8	Bio M110-7	Atox M106-7	Atox SG115-4	Tox SM098-	Tox G097-2	Tox G108-6	Tox M080-4
13										
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Bio= souche non productrice d'aflatoxine utilisé dans la lutte biologique; Tox= souche productrice de l'aflatoxine; Atox= souche non productrice de l'aflatoxine rencontré sur les échantillons de maïs et d'arachides au BF. + signal et – pas de signal

**oligo No.9**

5' -

TGATGTTTCTAGATAGTCCAAATGCCAGGGTTGGAGCTGATGGGGGAAAACTCTAAATCAGTTCAACATTCTCAA  
ATGTTAGCACATACAGTAATGTTACCATCAAGG-3'

**oligo No.10**

5' -

TGCTGCGGTCCATGTAGGTCAACTGTGTCTATTCAATGGCAAACTATCTGCTAACAGTGGAGCCATAGATGGTGG  
AAGAG-3'

Figure 11. Différentes amorces et sonde Padlock désignées ainsi que leurs régions de fixation (soulignées) sur les séquences, y compris les SNP présentés en rouge.

**Tableau 13. Résultat des réactions de LAMP**

oligo	Bio	Bio	Bio	Bio	Atox	Atox	Tox	Tox	Tox	Tox
No.#	M109-2	G018-2	M011-8	M110-7	M106-7	SG115-4	SM098-	G097-2	G108-6	M080-4
							13			
5	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
6	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Bio= souche non productrice d'aflatoxine utilisée dans la lutte biologique; Tox= souche productrice de l'aflatoxine; Atox= souche non productrice de l'aflatoxine rencontrée sur les échantillons de maïs et d'arachides au Burkina. + signal et - pas de signal

**Oligo N°5**

5' CGAAGAAGTATTTACCTATTTCATCAACGAGGGAAATTGGCCTTCGAAGGCGCTGTCAGTCTTTGTCGGGTTG  
ACTGGCCCTGTTTTGCTTTCGCTGGCGGTGATGCTGCGGTCCATGTAGGTCAACTGTGCTATTAAGGCAAA  
CTATCTGCTAACAGTCGAGCCATAGATGGTCGAAGAGATGACCAATGCAACAACCGCTGTTCCCTGTCTCTGAT  
GCTGACAGTGTTAATCAATGGGTCCATGGGATTTGGAATGATGATCGCCTTGTATTTCTGTCTCGGTGATAT 3'

**Oligo N°6**

5' CGAAGAAGTATTTACCTATTTCATCAACGAGGGAAATTGGCCTTCGAAGGCGCTGTCAGTCTTTGTCGGGTTG  
ACTGGCCCTGTTTTGCTTTCGCTGGCGGTGATGCTGCGGTCCATGTATTGTCAACTGGGGCTATTTAAAGGCAAA  
CGATCTGCTAACAGTCGAGCCATAGATGGTCGAAGAGATGACCAATGCAACAACCGCTGTTCCGCTGTCTCTGAT  
GCTGACAGTGTTAATCAATGGGTCCATGGGATTTGGAATGATGATCGCCTTGTATTTCTGTCTCGGTGATAT 3'

**Oligo N°7**

5' GCTGTCTAGTCTTTGTCGGGTTGACTGGCCCTGTTTTGCTTTCGCTGGCGGTGATGCTGCGGTCCATGTAGGT  
CAACTGTGTCTATTTCAATGGCAAACTATCTGCTAACAGTCGAGCCATAGATGGTCGAAGAGATGACCAATGCAAC  
AACCGCTGTTCCCTGTCTCTGATGCTGACAGTGTTAATCAATGGGTCCATGGGATTTGGAATGATGATCGCCTT  
GTATTTCTGTCTCGGTGATAT 3'

**Oligo N°8**

5' GAAGTGAGCTGGGTTGTTCCCTGGGGAAACCATTTCCATTCTCAAAAATGGCGCTGTTCTTTTGGAAAGTTATC  
AGCGCCACCGTCCAGTGCGACCGGATGGTACAATTGCTGTAATGCCATTTGAATCGTTTGTGATGTTTCTAGATA  
GTCCAAATGCCAGGGTTGGAGCTGATGGGGGAAAACTCTAAATCAGTTCAACATTCTCARATGTTAGCACATACA  
GTAATGTTACCATCAAGGATTTCGGTCCGCCAAAGTTCACCAAGAAATCCAATTCCTCGTCATTAAGCGGTTTCGAT  
GACTGGAGAGTCATCGCGTTCAGCCGGGGAAAGC 3'

Figure 10: Oligonucléotides désignés pour la méthode LAMP (soulignés) ainsi que leurs régions de fixation sur les séquences, y compris les SNPs présentés en rouge.

## 4. Discussion

La culture des souches sur les milieux PDA (milieu solide) et PDB (milieu liquide) indique que parmi les 22 souches, seulement 10 se sont développées avec succès comme l'indique le tableau 10. Le développement de ces souches s'explique par le fait qu'elles ont été isolées et conservées dans de bonnes conditions ce qui a facilité leur développement sur le milieu PDA et a permis une bonne production mycélienne. Cependant, le non développement des 12 autres souches pourrait être lié à des dommages (Thermiques) survenus lors de leur conservation et qui a causé la mort de ces conidies par conséquent leur revitalisation sur les milieux de culture a été impossible. La température joue un rôle très important dans la survie des agents fongiques. En revanche, d'autres tentatives ont été effectuées pour mettre en place un milieu plus favorable en l'occurrence le milieu de culture à base de jus de fruits et de légumes (Stringer et coll., 1999) sont restées sans effet.

Les fortes concentrations d'ADN (Tox GO97-2 (602 ng/ $\mu$ l), Tox G108-6 (369,17 ng/ $\mu$ l) et Tox M080-4 (191,50 ng/ $\mu$ l)) présentées par certaines souches ont permis de réaliser les expériences et les faibles concentrations observées pourraient s'expliquer par le fait que les ADN soient dégradés par les enzymes présentes dans les cellules. En ce qui concerne la qualité du matériel génétique, les différents ratios indiquent une richesse en hydrates de carbone de tous les échantillons par rapport à l'ADN (ratio<2) et une faible quantité en protéines (ratio>1,8). La quantité d'hydrates de carbone aurait pu être résiduelle en raison de la concentration de dextrose du milieu PDB ou de l'insuffisance de rinçage au moment des étapes de lavage pendant l'essorage des spores. Par conséquent, leur présence (milieu de culture) pourrait se révéler préjudiciable aux différentes réactions d'amplification (PCR, RCA et LAMP). Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenus par Lui *et al.* (2000) qui ont montré que ses éléments (PDB ou PDA) interfèrent dans les réactions d'amplifications.

La majorité des souches ont présenté des signaux lors des différentes réactions d'amplifications (PCR, RCA et LAMP) dirigées par les oligonucléotides désignés à l'exception de quelques souches (Les souches Bio G018-2 et Tox G097-2 et les souches Bio M109-2 et Tox SM098-13 dirigées respectivement par les amorces n°5 et n°6). Cependant, les différentes amorces et sondes n'ont pas pu discriminer les souches atoxinogènes des souches toxigènes.

Les résultats ainsi obtenus s'expliqueraient par le manque de certaines informations sur la totalité de la séquence des souches biologiques et le manque de séquençage des souches toxigènes et atoxigènes du Burkina. En effet, connaissant le potentiel des champignons à diverger en souches innombrables avec de petites différences génétiques, il semble peu probable que les souches non destinées à la production de l'aflatoxine puissent être regroupées dans un seul « cluster ». Étant donné que les polymorphismes peuvent facilement se produire par l'intermédiaire de facteurs mutagènes tels que les radiations (UV) ou les produits chimiques, il va de soi que les facteurs épi-génétiques jouent également un rôle important dans la différenciation d'un isolat parmi un groupe. Cependant, Doolittle et Sapienza (1980) affirment que les organismes tentent de s'adapter à certains changements de l'environnement et développent des aptitudes biologiques plus élevées pour assurer leur propre survie contre d'autres organismes. Les variations peuvent provenir du profil topographique, d'une région agricole fournissant de nombreux facteurs ayant un impact sur les communautés bactériennes et fongiques, telles que la capacité en eau, le rayonnement solaire, la composition du sol, la proximité d'autres champs qui ont été traités avec des engrais et pesticides et aussi la direction du vent. Donc l'hypothèse que les souches de *Aspergillus flavus* peuvent être divisées en de nombreux sous-types génétiques ne peut pas être rejeté car Baymann et Cotty (1991) ont montré que les variations génétiques des agents pathogènes se produisent au fil du temps. Nos résultats obtenus ne peuvent pas confirmer l'efficacité de ces méthodes (PCR, LAMP et RCA) même s'il serait rentable de contrôler l'application des souches antagonistes par l'intermédiaire de procédés d'amplification isotherme, car certaines techniques ne s'appliquent pas dans tous les cas. En outre, la méthode RCA comprend une étape de dénaturation et donc elle ne peut pas entièrement être qualifiée de « isotherme » et cela augmente le nombre d'étapes nécessaires pour atteindre de quelconques résultats (Alsmadi *et al.*, 2003 ; Pang *et al.*, 2007 ; Hadersdorfer, 2012). A l'étape actuelle de nos activités, il nous est impossible de confirmer la capacité de la méthode LAMP à détecter les SNPs, car les amorces de cette méthode pour la détection de SNP doivent être conçues manuellement et cela exige que de nombreuses conditions essentielles soient remplies au préalable. Un amplicon LAMP est composé d'au moins 180 paires de base et les séquences de ses amorces sont généralement plus longues que celui de PCR d'où la spécificité de la méthode LAMP. Jusqu'à présent, seules quelques publications sont engagées dans cette rubrique (Iwasaki *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2007).

## Conclusion générale et perspectives

Après l'alignement des 28 séquences des souches de *A. flavus* isolées en Afrique de l'Ouest, y compris quatre souches utilisées dans la lutte biologique avec logiciel Clustal X, une séparation en deux ou trois groupes a été observée. L'alignement des séquences a présenté un ou plusieurs points uniques de mutations. Au terme de notre étude, nous pouvons conclure que la conception de tests spécifiques pour discriminer les différentes souches de *A. flavus* a été un défi qui malheureusement n'a pas été relevé malgré la présence de SNP et cela pourrait s'expliquer par le manque de données de séquençage des souches atoxinogènes et toxinogènes isolées à partir de nos échantillons. L'extraction de l'ADN a donné suffisamment d'ADN pour toutes les expériences, de fortes concentrations d'ADN (Tox GO97-2 (602ng/μl), Tox G108-6 (369,17ng/μl) et Tox M080-4 (191,50ng/μl)) ont été obtenues, même si en général le ratio  $A_{230}/A_{260}$ , se référant à une forte concentration de glucides.

Bien que les souches Bio M110-7 et Bio M011-8 peuvent être regroupées en raison de certaines mutations ponctuelles semblables de leurs séquences qui apparaissent dans les résultats des analyses PCR pour les oligo set n° 4, cette information n'est pas suffisante pour l'élaboration d'un test spécifique pour la lutte biologique contre les souches toxigènes car G097-2 (atoxinogène) a aussi donné un signal négatif. A travers les résultats obtenus avec les différentes méthodes (LAMP et RCA) utilisées nous ne pouvons pas confirmer leur efficacité quant à la détection des polymorphismes nucléotidiques. Malheureusement les données des séquences utilisées ici pour l'étude de la phylogénicité n'ont pas fourni d'information suffisante pour discriminer les souches par les différentes méthodes d'amplifications.

Cependant, une bonne connaissance approfondie de la diversité génétique de ces micro-organismes serait un avantage dans la détermination des stratégies judicieuses pour une lutte efficace en mettant en place des tests spécifiques pour suivre l'évolution de ses souches dans le sol et sur les produits agricoles ainsi que les denrées alimentaires en stockage. Pour cela nous suggérons :

- un séquençage de tout le génome de toutes nos souches de *A. flavus* (Toxinogènes et atoxinogènes) collectées au Burkina Faso pour la comparaison entre les différents isolats.
- une modification du protocole d'extraction ou changer de kits commerciaux d'extraction et de purification.
- une vérification si possible de l'évolution de ses souches atoxinogènes dans les champs d'arachides et de maïs des différentes zones du Burkina Faso.

- Une reprise des expériences avec les différentes méthodes telles que la LAMP et RCA afin de vérifier leur efficacité dans la détection des SPNs.

## 5. Bibliographie

- Agrios G. N., 1988.** Plant Pathology. 3<sup>ème</sup> Edition *University of Massachusetts*. USA, 272 p.
- Alsmadi A. O., Bornarth J.C., Song W., Wisniewski M., Du J., Brockman J.P., Faruqi F. A., Hosono S., Sun Z., Du Y., Wu X., Egholm M., Abarzú P., Lasken R. S. & Driscoll M. D., 2003.** High accuracy genotyping directly from genomic DNA using rolling circle amplification based assay. *Biomedica central genomics*, 4: 21, 24P.
- Anjaiah, V., Mehan, V. K., Jayanthi, S., Reddy, D. V. R. & Mcdonald, D., 1989.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for aflatoxin BI estimation in groundnuts. ICRISAT, PP: 183-189.
- Atehnkeng J., Ojiambo P.S., Ikotun T., Skora R.A., Cotty P.J. & Bandyopadhyay R., 2008.** Evaluation of otxigenic isolates of *Aspergillus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food Additives and Contaminats*, vol.25, No 10, PP: 1264-1271.
- Bandyopadhyay R. & Cardwell K. F., 2001.** Species of Trichoderma and Aspergillus as biological control agents against plant diseases in Africa. In: Neuen schwander P, Borgemeister C, Langewald J, editors. Biological control in integrated pest management systems in Africa. *Wallingford: CABI Publ.* PP: 193–206.
- Barreiro L. B., Laval G., Quach H., Patin E. & Quintana-Murci L., 2008.** Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nature Genetics*, 40, PP: 340–345.
- Batra A. & Saxena R. K., 2005.** Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, *Process Biochemistry*. 40, PP: 1553–1557.
- Bayman P. & Cotty J. P., 1993.** Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: Association with aflatoxine production and morphology. *Can. J. Bot.* 71, PP: 23-34.
- Bhatnagar D., Herlich K. C. & Clevel T. E., 2003.** Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis, *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 61(2), PP: 83-97.

- Boiron P., 2006.** Champignons toxigènes et mycotoxicoïses. Laboratoire de Mycologie, Faculté de Pharmacie, Lyon, France. 71p.
- Bourais I., Amine A., 2006.** Aflatoxines: Toxine redoutables dans nos aliments. Laboratoire des analyses Chimiques et Biocapteurs, Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia. *Les techniques de laboratoires*, vol. 1, No. 0, PP: 4-8.
- Brochard G. & Le Bacle C., 2009.** Mycotoxine en milieu du travail. Département d'étude et assistance médicale INRS, document pour le médecin du travail, No. 119, PP: 299-323.
- Brown R. L., Chen Z. Y., Clevel T. E., Cotty P. J. & Cary J. W., 2001.** Variation *in vitro* - amylase and protease activity is related to the virulence of *Aspergillus flavus* isolates. *Journal of Food Protection*. 64, PP: 401–404.
- Campbell N.A. & Reece J. B., 2007.** Biologie, Pearson Education, 7<sup>ème</sup> édition, 438p.
- Chang P.K., Ehrlich K.C. & Hua S., 2006.** Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. *Int J Food Microbiol*. 108, PP: 172-177.
- Cotty P.J., 1989.** Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains on pathogenic on cotton. *Phytopathology*. 79, PP: 808-814.
- Cotty P.J., 1990.** Effect of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on aflatoxin contamination of developing cottonseed. *Plant Disease*. 74, PP: 233-235.
- Cruz P. & Buttner P. M., 2008.** Development and evaluation of a real-time PCR assay for *Aspergillus flavus*. *The Mycologia Society of America*, Lawrence. 100(5), PP:683-690.
- Demidov V., 2002.** Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity, US National Library of Medicine National Institutes of Health, *Expert Rev Molecule Diagnostic*. 2 (6), PP: 542-8.
- DFGSM, 2013.** Interactions Hôte - Agents infectieux *Aspergillus*. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes. 2(3), 12p.
- DGPSA/MAHRH 2013.** Résultats définitifs et perspectives alimentaires Campagne Agricole. Ministère de l'Agriculture de l'Hydraulique et des Ressources Halieutiques, Ouagadougou, Burkina Faso. 58p.

**Dorner J.W. & Horn B.W., 2007.** Separate and combined application of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* for biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*.163, PP: 215-223.

**Ehrlich K. C., Montalbano B. G., & Cotty P. J., 2003.** Sequence comparison of aflR from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. US Department of Agriculture, Southern Regional Research Center, Agricultural Research Service, New Orleans, LA 70179-0687, USA. *Fungal Genetics and Biology*. No.38, PP: 63–74.

**Ehrlich K.C., 2006.** Evolution of the aflatoxin gene cluster. Southern Region Research center/Agricultural Research Service USDA *New Orland Mycotoxin research*, vol. 22, No.1, PP: 9-15.

**Fire A., Xu S., 1995.** Rolling Circle Replication of short DNA circles. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 92 (10), PP: 4641-4645.

**Geiser, D. M., Pitt, J. I., & Taylor, J. W., 1998.** Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, PP: 388 – 393

**Guo B. Z., Russin J. S., Clevel T. E., Brown R. L. & Damann K. E., 1996.** Evidence for cutinase production by *Aspergillus flavus* and its possible role in infection of corn kernels. *Phytopathology*. 86, PP:824–829.

**Hadersdorfer J., 2012.** Potyvirus Advances in research and application, scholarly edition. 160(04), PP:456 466.

**Handles E., 2012.** La contamination par les aflatoxines et la contamination par les fumonisines de la farine d’igname des marchés au Nigeria. *Food Control*, 25(1), 53p.

**Hasan H. A. H., 1999.** Fungal utilization of organophosphate pesticides and their degradation by *Aspergillus flavus* and *A. sydowii* in soil. *Folia Microbiologica*. 44, PP:77–84.

**Henry S. H., Bosch x. F., Troxell, T. C., & Bolger P. M. 1999** Réduire le cancer du foie – Contrôle Internationale de l’aflatoxine. *Science*. 286(5449), PP: 2453–2454.

**Horn B. W., 2005.** Ecology & population biology of aflatoxigenic fungi in soil. In: Abbas HK, editor. *Aflatoxin and food safety*. PP: 95–116.

**Horn B.W. et Dorner T. C., 2007.** Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavus* in the United States: a review *Food Addit Contam.* 24, PP:1088-1101.

**Hyde K. D. & Soyong K., 2008.** The fungal endophyte dilemma, *Fungal diversity.* 33, PP: 163-173.

**INRA, 2004.** Etude de l'alimentation totale française (EAT1). Mycotoxines, minéraux et éléments de traces. 68p.

**Iwamoto T., Sonobe T. & Hayashi K., 2003.** Loop-mediated Isothermal Amplification for Direct Detection *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in Sputum Samples. *J Clin Microbiol.* 41(6), PP:2616-2622.

**Iwasaki Y., Hosoya T., Takebayashi H., Ogawa, Y., Hotta Y. & Ikenaka, K., 2003.** The potential to induce glial differentiation is conserved between *Drosophila* and mammalian glial cells missing genes. *Development.* 130(24), PP:6027-6035.

**Jutta W., Ohlendorf B., Blümel M., Schmaljohann R. & Imhoff J.F., 2011.** Phylogenetic Identification of Fungi Isolated from the Marine Sponge *Tethyaaurantium* and Identification of Their Secondary Metabolites. *Marines Drugs.* 9, PP: 561-585.

**Kensler, T. W., Roebuck, B. D., Wogan, G. N., & Groopman, J. D., 2010.** Aflatoxin: Une odysée de 50 ans sur la toxicologie mécaniste et translationnelle. *Toxicological Sciences,* 120(1), PP: 28–48.

**Khlangwis P., 2011.** Reducing the Risks of Aflatoxin through Public Health Interventions. Health, Graduate School of Public Health, University of Pittsburgh. PhD, 145p.

**Kilch M. A., 2002.** Identification of common *Aspergillus* species. *The Netherlands:* Central bureau Voor Schimmel cultures. 53p

**Kulwant S., Jens C. F., Vif T. & Mathur S. B., 1991.** An illustrated manual on identification of some *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxin, Edition I. *Ryvangs Alle* 78. DK-2900 Hellerup, Denmark, 98 p.

**Leslie J. F., B&yopadhyay R., & Visconti A., 2008.** Mycotoxin: detection methods management, *Public health and agricultural trade*, Wallingford, UK, 27p.

**Li, F., Li, Y., Wang, Y., & Luo x., 2009.** Phénomène naturel des aflatoxines dans le beurre d'arachide et la pâte de sésame chinois. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(9), PP: 3519–3524.

**Lizardi M. P., Huang X., Zhu Z., Bray-Ward P., Thomas C. D. & Ward C. D., 1998.** Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature America Inc.* <http://genetics.nature.com>, *new technology*. volume 19, PP: 225-232.

**Long K., Ghazali H. M., Ariff A., Man Y. C. & Bucke C., 1998.** Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus flavus* Link. *Biotechnology Letters*. 20, PP:369–372.

**Mathur S. B. & Kongsdal O., 2003.** Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. First edition, *Kandrup Bogtrkkeri Publication*, Denmark. 425 p.

**Mehan, V. K., McDonald, D., Haravu, L. J. & Jayanthi, S., 1991.** The groundnut aflatoxin problem. Review and literature database (chap. 7). ICRISAT, India. PP: 15-28.

**Mehl H.L., Cotty P.J., 2009.** Variation in competitive ability among isolates of *Aspergillus flavus* from different vegetative compatibility groups during Maize infection. U.S. Departement of Agriculture- Agricultural Research Service School of plant Sciences, the University of Arizona, *America Phytopathological society*. Vol. 100, No.2, PP: 150-159.

**Mellon J. E. & Cotty P. J., 2004.** Expression of pectinase activity among *Aspergillus flavus* isolates from south- western and southeastern United States. *Mycopathologia*. 157, PP:333–338.

**Mullis, K.B. & Faloona F.A., 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155, PP:335-50.

**Mutegi, C. K., Ngugi H. K., Hendriks S. I., & Jones R. B., 2009.** Prévalence et les facteurs associés à la contamination par l'aflatoxine de l'arachide de l'Ouest du Kenya. *International Journal of Food Microbiology*. 130(1), PP: 27–34.

**Nagamine K., Hase T. & Notomi T., 2002.** Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. 16, PP : 223-229

**Nakamura Y., Kagesawa T., Nishikawa M., Hayashi Y., Kobayashi S., Niimi T. & Matsuno K., 2007.** Soma-dependent modulations contribute to divergence of rhomboid expression during evolution of *Drosophila* eggshell morphology, *Development*. 134 (8), PP: 1529-1537.

**Nikiema P. A., 1993.** Détermination quantitative et qualitative des aflatoxines de L'arachide par des tests biochimiques et immunologiques. Sciences Biologiques Appliquées, thèse de doctorat de spécialité. Faculté des sciences et techniques. Université de ouagadougou. 118p.

**Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., 2000.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28(12), PP:I-VII

**Otsuki T., Wilson J. S., et Sewadeh M., 2001.** Quelle précaution de prix. L'harmonisation européenne des réglementations relatives aux aflatoxines et les exportations d'arachide africaine. European Review of Agricultural Economics. *Oxford Journal database*. 28(2), PP: 263–283.

**Pagne G.S., 1992.** Aflatoxin in maize. *Crit Rev Plant Sci*. 10, PP:423-440.

**Pang Y., Peel G. J., Wright E., Wang Z., & Dixon R. A., 2007.** Early steps in proanthocyanidin biosynthesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*. 145, PP: 601–615.

**Payne G. A., 1998.** Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In: Sinha KK, Bhatnagar D, editors. Mycotoxins in agriculture and food safety. New York: Marcel Dekker. PP: 279–306.

**Pickering M.C., Cook H.T. & Warren J., 2002.** Uncontrolled C3 activation cause membrano proliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor, H. *Nat. genet*. 31, PP: 424-428.

**Pitt J. I. & Hocking A. D., 1999.** Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*. 162, PP:233-243.

**Poignées E., 2012.** La contamination par les aflatoxines et la contamination par les zéaralénone de la farine d'igname des marchés au Nigeria. *Contrôle des aliments*. 25 (1), 53p.

**Poitras E. et Houde A., 2002.** La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology & Biotechnology* by the Moroccan Society of Biology in Canada. Vol.2(2), PP: 2-11.

**Quillien J. F., 2002.** Les Mycotoxines. Institut National de la Recherche Agronomique France. INRA, (3), 15p.

**Robens J. & Cardwell, 2003.** The cost of the mycotoxin management to the USA: management of the mycotoxin in the united states, *journal of toxicology*. 22, PP: 139-152.

**Samson R. A., Hoekstra E. S. & Filtenborg O., 2000.** Introduction to food and airborne fungi. 6<sup>th</sup>ed. Utrecht, *the Nerlands*: Central bureau Voor Schimmel cultures.

**Sanou A., 2011.** Création et évaluation d'hybrides et de lignées de maïs dans le cadre d'une intensification de la maïsiculture au Burkina Faso. Université polytechnique de Bobo-Dioulasso, Mémoire de fin de cycle. 106p.

**Schewitzer B. & Kingsmore S., 2001.** Combining nucleic acid amplification & detection, Elsevier Science, *Current Opinion in Biotechnology*. 12, PP: 21-27.

**SN, 2010.** Recherche: les divers usages de l'arachide: L'IITA trouve à boire et à manger dans l'arachide. Le Quotidien. 56p.

**Schochetman G., Ou C.Y. & Wanda K. J., 1988.** Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Infectious Diseases*. Vol. 158, No. 6, PP: 1154-1157.

**St. Leger R. J., Joshi L. & Roberts D. W., 1997.** Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and ento-mopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology*. 143, PP: 1983-1992.

**Stringer S. C., Haque N. & Peck M., W., 1999.** Growth from spores of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Heat Treated vegetable juice. *Applied and environmental Microbiology*. 65(5), PP: 2136-2142.

**Tran-Dinh N., Pitt J. I. & Carter D. A., 1999.** Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycological Research*. 103, PP: 1485-1400.

**Wagacha, J. M. & Muthomi, J. W., 2008.** Problème des mycotoxines en Afrique- état actuel, les implications pour la sécurité des aliments et la santé et les stratégies la gestion possible. *International Journal of Food Microbiology*. 124(1), PP : 1-12.

**Wague, J. M. et Fire, J. W., 2008.** Problème des mycotoxines en Afrique-état actuel, les implications pour la sécurité des aliments et la santé et les stratégies de la gestion possible. *International Journal of Food Microbiology*, 124p.

**Wang, G.; Li, Q. & Zhu, P., 2008,** Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian sponges *Suberiteszeteki* and *Gelliodesfibrosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93, PP:163–174.

**Wiese J., Ohlendorf B., Blümel M., Schmaljohann R. & Imhoff J. F., 2011.** Phylogenetic Identification of Fungi Isolated from the Marine Sponge *Tethyaaurantium* and Identification of Their Secondary Metabolites. *Marine Drugs*. volume 9, PP:561-585.

**Wild C. P., 2007.** Aflatoxine exposure in developing countries: the critical interface of agriculture and health. *Food Nutr Bull*.28:S372-S380.

**Wilhelm J. & Pingoud A., 2003.** Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Chembiochem*. 4(11), PP:1120-8.

## **Webographie**

**AFSSA, 2009.** Evaluation des risques liés à la présence des mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaines et animales. Rapport synthétique final [http://www.anses.fr/Documents/RCP-Ra Mycotoxines 2009.pdf](http://www.anses.fr/Documents/RCP-Ra_Mycotoxines_2009.pdf).

**Center for Integrated Fungal Research (CIFR).** <http://www.aspergillusflavus.org/aflavus>

**Cheng F., 2007.** Etude de cas 3-11, “Sécurité des aliments: le cas de L’aflatoxine”. in: Per Pinstrup-andersen and fuzhicheng (eds.), *Food Policy for Developing countries: case Studies*. Available at: [http://cip.cornell.edu/dns\\_gfs/12004281615](http://cip.cornell.edu/dns_gfs/12004281615)

**Cline H., 2005.** Arizona cotton growers successful in aflatoxin control program. *Western Farm Press* [serial on the Internet]. [accede le 10/5/2012]: Disponible sur: <http://westernfarmpress.com/news/3-24-05-Arizona-cotton-aflatoxin/>.

**inVS, 2010.** Projections de l’incidence et de la mortalité par cancer en France 2010 ([http://www.invs.sante.fr/application/cancersprojections\\_2010/donnees\\_generales.htm](http://www.invs.sante.fr/application/cancersprojections_2010/donnees_generales.htm)).

**World Trade Organisation (WTO), 1998.** Comprendre l’accord OMC sur les mesures sanitaires et phytosanitaires. Retrieved at [http://www.wto.org/english/tratop\\_e\\_sps\\_e/spsund\\_e.htm](http://www.wto.org/english/tratop_e_sps_e/spsund_e.htm) and A on January 7, 2012



# Annexes

## Sequence alignment for AAP

1

M092-15	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
G045-11	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M083-14	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M015-14	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M031-15	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M102-11	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
G018-2	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M035-1	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M050-1	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
G108-3	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M109-2	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M003-5	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M118-2	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M054-6	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M068-10	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M125-10	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
G060-1	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M058-11	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M069-12	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M129-5	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M123-4	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M130-3	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M096-14	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M055-12	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
G067-10	GCAAA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
G111-8	GCAGA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M110-7	GCAGA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA
M011-8	GCAGA	GGCG	CC	CC	G	GC	GAGCGAGA	GGAGGGACAA	CCAA	C	ACC	GAGACAAGGA	CGAC	T	GA

71

M092-15	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
G045-11	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M083-14	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M015-14	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M031-15	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M102-11	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
G018-2	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M035-1	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M050-1	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
G108-3	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M109-2	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M003-5	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M118-2	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M054-6	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M068-10	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M125-10	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
G060-1	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M058-11	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M069-12	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M129-5	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M123-4	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M130-3	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M096-14	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M055-12	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
G067-10	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
G111-8	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M110-7	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG
M011-8	GAC	CGCA	GGGAAAGCG	CCC	G	C	T	G	AAGG	GAGG	GCC	C	A	A	A	CCC	CGA	CAACAGACG

141

M092-15	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
G045-11	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M083-14	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M015-14	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M031-15	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M102-11	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
G018-2	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M035-1	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M050-1	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
G108-3	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M109-2	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M003-5	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M118-2	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M054-6	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M068-10	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M125-10	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
G060-1	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M058-11	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M069-12	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M129-5	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M123-4	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M130-3	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M096-14	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M055-12	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
G067-10	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
G111-8	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M110-7	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG
M011-8	GC	AAAGCCA	CAA	GATA	GAGAAAC	GGG	GAG	CC	GG	GGG	A	AGC	GC	ACGC	G	GG

211

M092-15	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
G045-11	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M083-14	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M015-14	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M031-15	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M102-11	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
G018-2	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M035-1	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M050-1	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
G108-3	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M109-2	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M003-5	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M118-2	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M054-6	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M068-10	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M125-10	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
G060-1	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M058-11	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M069-12	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M129-5	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M123-4	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M130-3	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M096-14	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M055-12	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
G067-10	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
G111-8	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M110-7	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA
M011-8	CACA	GGGA	GGGG	AATC	ATG	AAGCCA	TA	AGACCC	G	GCGGG	G	GACC	CG	G	GC	AAAG	TA







701

M092-15	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
G045-11	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M083-14	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M015-14	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M031-15	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M102-11	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
G018-2	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M035-1	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M050-1	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
G108-3	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M109-2	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M003-5	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M118-2	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M054-6	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M068-10	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M125-10	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
G060-1	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M058-11	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M069-12	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M129-5	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M123-4	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M130-3	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M096-14	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M055-12	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
G067-10	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
G111-8	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M110-7	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC
M011-8	CCGCAAGG	AACGAAAG	AAACAAGG	CAAGCCCA	AACCTAC	CAGGCGGAC	ACGCCC

771

M092-15	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
G045-11	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M083-14	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M015-14	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M031-15	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M102-11	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
G018-2	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M035-1	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M050-1	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
G108-3	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M109-2	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M003-5	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M118-2	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M054-6	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M068-10	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M125-10	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
G060-1	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M058-11	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M069-12	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M129-5	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M123-4	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M130-3	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M096-14	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	GCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M055-12	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	ACCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
G067-10	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	ACCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
G111-8	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	ACCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M110-7	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	ACCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG
M011-8	ACCCAAGCG	AAAGGCCCA	TAGCAAGG	GACCTCTG	ACCTCCGCG	AACACAA	TGCGCGG





1121

M092-15	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
G045-11	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M083-14	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M015-14	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M031-15	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M102-11	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
G018-2	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M035-1	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M050-1	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
G108-3	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M109-2	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M003-5	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M118-2	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M054-6	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M068-10	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M125-10	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
G060-1	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M058-11	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M069-12	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M129-5	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M123-4	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M130-3	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M096-14	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M055-12	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
G067-10	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
G111-8	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M110-7	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG
M011-8	GG	CGAAGAG	A	GACCAA	G	CAACAACCGC	G	CGCG	G	CGCGA	GC	GACAG	G	AA	CAA	GGG

1191

M092-15	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
G045-11	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M083-14	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M015-14	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M031-15	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M102-11	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
G018-2	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M035-1	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M050-1	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
G108-3	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M109-2	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M003-5	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M118-2	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M054-6	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M068-10	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M125-10	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
G060-1	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M058-11	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M069-12	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M129-5	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M123-4	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M130-3	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M096-14	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M055-12	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
G067-10	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
G111-8	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M110-7	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT
M011-8	CCA	GGGA		GGAA	GAT	GA	CGCC	G	AA	CGGC		CGG	GAT	AT

# Sequencealignment for GLCA

	1							
M092-15	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M130-3	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
G045-11	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M083-14	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
G108-3	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M003-5	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M015-14	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M031-15	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M096-14	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M123-4	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M068-10	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M102-11	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
G060-1	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M058-11	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M069-12	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M129-5	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M050-1	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M109-2	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M118-2	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M054-6	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
G018-2	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M125-10	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
G111-8	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M110-7	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M011-8	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M035-1	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
M055-12	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA
G067-10	A	GAAGCGAA	AAACGACCA	CACGATC	GCGAGGTA	CGGAAGCCAA	GGGCTGG	GGCCAA

	71							
M092-15	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M130-3	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
G045-11	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M083-14	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
G108-3	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M003-5	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M015-14	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M031-15	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M096-14	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M123-4	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M068-10	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M102-11	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
G060-1	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M058-11	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M069-12	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M129-5	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M050-1	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M109-2	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M118-2	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M054-6	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
G018-2	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M125-10	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
G111-8	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M110-7	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M011-8	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M035-1	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
M055-12	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT
G067-10	C	CACAGGC	AAAGAAGTGA	GGGTTGT	CCGCGGAA	ACCAATCCA	CAAAAA	GGCGCGT



281

M092-15 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M130-3 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
G045-11 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M083-14 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
G108-3 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M003-5 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M015-14 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M031-15 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M096-14 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M123-4 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M068-10 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M102-11 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
G060-1 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M058-11 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M069-12 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M129-5 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M050-1 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M109-2 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M118-2 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M054-6 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
G018-2 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M125-10 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
G111-8 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M110-7 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M011-8 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M035-1 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
M055-12 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG  
G067-10 AACATTC CA AAGTAGCA CAACAGAA GTACCAAC AAGGAA CG GCGCCAAA GACCAAG

351

M092-15 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M130-3 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
G045-11 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M083-14 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
G108-3 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M003-5 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M015-14 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M031-15 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M096-14 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M123-4 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M068-10 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M102-11 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
G060-1 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M058-11 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M069-12 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M129-5 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M050-1 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M109-2 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M118-2 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M054-6 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
G018-2 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M125-10 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
G111-8 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M110-7 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M011-8 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M035-1 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
M055-12 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC  
G067-10 AATCCAAATC CCGCATA AGCGGCGA GACGGAGA GCAACGGT CAGCCGGG AAAGCGAGAC

421

M092-15	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M130-3	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
G045-11	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M083-14	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
G108-3	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M003-5	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M015-14	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M031-15	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M096-14	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M123-4	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M068-10	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M102-11	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
G060-1	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M058-11	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M069-12	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M129-5	AA	CGACGA	TA	GGAA	AC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCA	AA	AA	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG
M050-1	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		
M109-2	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		
M118-2	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		
M054-6	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		
G018-2	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		
M125-10	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		
G111-8	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		
M110-7	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		
M011-8	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		
M035-1	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		
M055-12	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		
G067-10	AA	CGGCGA	TA	GGAA	GC	C	GA	CA	TC	AA	TTTTC	C	GCAGCAAC	CT	AGGCCAAA	GG	CT	GG		

491

M092-15	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M130-3	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
G045-11	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M083-14	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
G108-3	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M003-5	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M015-14	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M031-15	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M096-14	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M123-4	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M068-10	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M102-11	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
G060-1	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M058-11	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M069-12	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M129-5	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	G	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGC	GCACAA
M050-1	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA
M109-2	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA
M118-2	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA
M054-6	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA
G018-2	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA
M125-10	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA
G111-8	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA
M110-7	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA
M011-8	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA
M035-1	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA
M055-12	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA
G067-10	C	CAGAG	AC	AGG	TA	ACA	AAA	GG	GGAGAA	A	CG	AG	CCC	AGC	GGG	GG	CGG	GCACAA





841

M092-15	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M130-3	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
G045-11	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M083-14	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
G108-3	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M003-5	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M015-14	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M031-15	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M096-14	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M123-4	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M068-10	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M102-11	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
G060-1	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M058-11	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M069-12	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M129-5	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M050-1	GTGGGAA	CGCGATA	CC	GTTCCTGTA	ATGCA	GGTA	GCCG	AGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M109-2	GTGGGAA	CGCGATA	CC	GTTCCTGTA	ATGCA	GGTA	GCCG	AGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M118-2	GTGGGAA	CGCGATA	CC	GTTCCTGTA	ATGCA	GGTA	GCCG	AGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M054-6	GTGGGAA	CGCGATA	CC	GTTCCTGTA	ATGCA	GGTA	GCCG	AGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
G018-2	GTGGGAA	CGCGATA	CC	GTTCCTGTA	ATGCA	GGTA	GCCG	AGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M125-10	GTGGGAA	CGCGATA	CC	GTTCCTGTA	ATGCA	GGTA	GCCG	AGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
G111-8	GTGGGAA	CGCGATA	CC	GTTCCTGTA	ATGCA	GGTA	GCCG	AGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M110-7	GTGGGAA	CGCGATA	CC	GTTCCTGTA	ATGCA	GGTA	GCCG	AGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M011-8	GTGGGAA	CGCGATA	CC	GTTCCTGTA	ATGCA	GGTA	GCCG	AGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M035-1	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
M055-12	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG
G067-10	GTGGGAA	AGCGATA	CC	GTTCCTGCA	ATGCA	GGTA	GCCG	CGGC	CAC	GCAGGC	GC	GGCGGAG

911

M092-15	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M130-3	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
G045-11	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M083-14	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
G108-3	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M003-5	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M015-14	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M031-15	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M096-14	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M123-4	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M068-10	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M102-11	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
G060-1	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M058-11	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M069-12	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M129-5	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M050-1	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	GCACANG	ATGG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M109-2	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	GCACANG	ATGG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M118-2	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	GCACANG	ATGG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M054-6	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	GCACANG	ATGG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
G018-2	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	GCACANG	ATGG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M125-10	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	GCACANG	ATGG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
G111-8	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	GCACANG	ATGG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M110-7	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	GCACANG	ATGG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M011-8	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AC	GCACANG	ATGG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M035-1	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AT	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
M055-12	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AT	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG
G067-10	TTGGCCTG	AGCCGACAGA	GCA	GTCCCT	AT	ACATA	ANG	ATGG	ATGG	GGCCGCGAGG	CGAGCCACCG

M092-15 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M130-3 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
G045-11 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M083-14 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
G108-3 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M003-5 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M015-14 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M031-15 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M096-14 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M123-4 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M068-10 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M102-11 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
G060-1 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M058-11 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M069-12 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M129-5 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M050-1 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M109-2 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M118-2 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M054-6 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
G018-2 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M125-10 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
G111-8 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M110-7 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M011-8 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M035-1 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
M055-12 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG  
G067-10 GGTCGAGAA GAACACCTTC CACGGAAAAG AAAAGACCG