

Institut für Bodenökologie
GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

**Charakterisierung von mikrobiellen, C-P-Lyase kodierenden Genen in zwei
unterschiedlichen Ackerböden**

Heidrun Karl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Huber
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. C. Munch
2. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Die Dissertation wurde am 24.05.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.12.2007 angenommen.

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Munch, für die Bereitstellung des Themas, die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut sowie für sein Interesse an dieser Arbeit, seine Verbesserungsvorschläge und seine Unterstützung.

Bei Herrn Dr. Michael Schloter möchte ich mich für den unerschütterlichen Glauben an das Gelingen meines Projektes Metagenombank etc. bedanken. Er hat trotz eines sehr stressigen Tagesgeschäftes immer Zeit für Anregungen und Diskussionen gefunden.

Herrn Prof. Scherer und Herrn Prof. Huber möchte ich dafür danken, dass sie sich als Zweitgutachter und als Vorsitzenden der Prüfungskommission zur Verfügung gestellt haben.

Dr. Marion Engel danke ich für ihre Hilfe, ihr Interesse an dem Gelingen meiner Arbeit, für ihre Zeit, für Ihre Ermutigungen und dafür, dass ich jederzeit zu ihr kommen konnte und Probleme diskutieren konnte.

Bei Dr. Karin Pritsch und Dr. Alexandra Hagn möchte ich mich sehr herzlich für ihre Ermutigungen und die Korrektur meiner schriftlichen Ausführungen bedanken. Beide haben trotz eines stressigen Arbeitsalltags spontan Zeit gefunden, meine Arbeit zu korrigieren und konstruktiv Kritik zu üben.

Bei Herrn Rolf Schilling möchte ich mich für seine Unterstützung bei dem Projekt Mikrokosmenanlage bedanken.

Bei Daniel Bindernagel und Walkiria Levy-Lopez möchte ich mich für die Hilfe im Labor während ihrer Zivildienst- und Praktikumszeit bedanken.

Conny Galonska und Dr. Ursula Bausenwein danke ich dafür, dass ich die Sterilbank non-stop benutzen durfte und für Ihre Laborunterstützung.

Bei der ganzen AG Schloter möchte ich mich für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meinen Eltern und Geschwistern möchte ich für ihre Unterstützung und den Glauben an mich danken.

Meinem Freund Michael möchte ich für sein Verständnis danken und dafür, dass er mir so lange versichert hat, dass ich es irgendwann schaffen werde, bis ich selbst daran geglaubt habe.

Erfolg haben heißt, einmal mehr aufzustehen als man hingefallen ist.

Winston Churchill

Meiner Familie

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abkürzungsverzeichnis	V
III. Abbildungsverzeichnis	VIII
IV. Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Stand des Wissens und Zielsetzung	3
2.1 Mikrobielle Leistung und Qualität von Böden.....	3
2.2 Auf der Suche nach mikrobiellen Funktionen.....	4
2.2.2 Kultivierungsunabhängige Techniken.....	5
2.2.2.1 Shotgun-Sequenzierungen.....	5
2.2.2.2 Einsatz von degenerierten Primern	6
2.2.2.3 Metagenombanken	6
2.2.2.3.1 Klonierungsvektoren	8
2.2.2.3.2 Screening von Metagenombanken	9
2.3 Phosphonat-Pestizide	12
2.3.1 Glyphosat	12
2.3.1.1 Applikation von Glyphosat	13
2.3.1.2 Glyphosatresistente Pflanzen	13
2.3.1.3 Abbau von Phosphonaten.....	14
2.4 Das C-P-Lyase-Operon	15
2.5 Abbau von Glyphosat im Boden	16
2.6 Zielsetzung	18
3. Material und Methoden	20
3.1 Bodenmaterial und experimentelles Design des Modellversuchs.....	20
3.2 Mikroorganismenstämme und Plasmide	23
3.3 Kultivierungsabhängige mikrobiologische Methoden	24
3.3.1 Nährmedien	24
3.3.2 Hemm- und Zusatzstoffe	25
3.3.3 Bakterienkultivierung.....	26
3.3.4 Gewinnung potenzieller Glyphosat abbauender Isolate.....	26
3.3.5 Stammhaltung.....	26
3.3.6 Physiologische Identifizierung der Isolate	26
3.3.7 Nukleinsäureisolierung aus Bakterien.....	27
3.4 Kultivierungsunabhängige mikrobiologische Methoden	27
3.4.1 Nukleinsäureisolierung aus dem Boden.....	27
3.4.2 <i>In-vitro</i> -Amplifizierung von DNS mittels Polymerasekettenreaktion	27

3.4.2.1 Prinzip der PCR (Mullis <i>et al.</i> , 1986 ; Saiki <i>et al.</i> , 1988)	27
3.4.2.2 Verwendete Oligonukleotid-Primer für PCR- und Sequenzierungstechniken.	28
3.4.2.3 Standardbedingungen zur Amplifizierung von Zielsequenzen	28
3.4.3 Isolierung, Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten	30
3.4.4 Klonierung von PCR-Fragmenten.....	31
3.4.5 Präparation rekombinanter Plasmide	32
3.4.6 Spaltung von DNS mittels Restriktionsendonukleasen.....	32
3.4.7 Gelelektrophorese.....	32
3.4.7.1 Agarosegelelektrophorese	33
3.4.7.2 Pulsfeldgelelektrophorese	33
3.4.7.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese und Silberfärbung	34
3.4.8 Erstellen einer Metagenombank.....	34
3.4.8.1 Isolierung und Aufreinigung hochmolekularer DNS aus dem Boden	34
3.4.8.2 Partieller Restriktionsverdau der aufgereinigten hochmolekularen DNS	36
3.4.8.3 Präparation des Vektors pBeloBAC11.....	36
3.4.8.4 Präparativer Restriktionsverdau von pBeloBAC11	38
3.4.8.5 Dephosphorylierung von pBeloBAC11	38
3.4.8.6 Ligation von hochmolekularer DNS mit dem Vektor pBeloBAC11	39
3.4.8.7 Transformation von <i>E. coli</i>	39
3.4.8.8 Anzucht und Stammhaltung der Klone der Metagenombank	40
3.4.9 Charakterisierung der Metagenombank	40
3.4.9.1 Bestimmung der Insertgrößen	40
3.4.9.2 Charakterisierung der Gene der Metagenombank (Endsequenzierungsansatz)	41
3.4.10 Screening der Metagenombank.....	41
3.4.10.1 Funktionelles Screening der Metagenombank	41
3.4.10.1.1 Vorscreening der Metagenombank	41
3.4.10.1.2 INT-Test	42
3.4.10.1.3 Glyphosatanalytik.....	44
3.4.10.2 Screening der Metagenombank auf DNS-Ebene	45
3.4.11 Sequenzanalyse, Auswertung der Sequenzdaten und Rekonstruktion von Stammbäumen.....	45
3.4.12 Rarefactionkurven	46
4. Ergebnisse	48
4.1 Effekt der Glyphosataufbringung auf Gasemissionen im Mikrokosmenexperiment.....	48
4.2 Kultivierungsabhängiger Ansatz: Isolierung und Identifizierung glyphosatabbauender Bakterien	50
4.2.1 Isolierung glyphosatabbauender Bakterien	50
4.2.2 Identifizierung potenziell glyphosatabbauender Bakterien.....	50
4.3 Glyphosatabbaufähigkeit der aus A17 und NM isolierten Bakterien	53

4.3.1 Wachstum in Flüssigmedium	53
4.3.2 INT-Test	54
4.4 Glyphosatanalytik ausgewählter Isolate aus A17 und NM	55
4.5. Identifizierung von <i>phnJ</i> -Genfragmenten bei den isolierten Bakterien	56
4.5.1 Virtuelle PCR mit dem Primerpaar <i>phnJ1/phnJ2</i>	56
4.5.2 Detektion eines <i>phnJ</i> -Genfragmentens in <i>Oceanobacillus iheyensis</i>	58
4.5.3 Screening der isolierten Bakterien nach <i>phnJ</i> -Genfragmenten	59
4.6 Kultivierungsunabhängiger Ansatz: Erstellen und Charakterisierung einer Metagenombank	62
4.6.1 Erstellen einer Metagenombank.....	62
4.6.2 Charakterisierung der Metagenombank	65
4.6.2.1 Bestimmung der Insertgrößen der Metagenombank	65
4.6.2.2 Charakterisierung der Gene der Metagenombank.....	67
4.6.2.2.1 Bestimmung des G + C-Gehalts.....	67
4.6.2.2.2 BlastX Ergebnisse	68
4.6.2.3 Phylogenetische Charakterisierung der Metagenombank	73
4.6.3 Screening der Metagenombank	73
4.6.3.1 Funktionelles Screening der Metagenombank	73
4.6.3.2 Screening der potenziell positiven Klone auf DNS-Ebene	74
4.6.3.3 Untersuchung ausgewählter Klone auf Glyphosatabbaufähigkeit	77
4.7 Nachweis von <i>phnJ</i> -Genfragmenten im Boden.....	78
4.7.1 Virtuelle PCR mit dem Primerpaar <i>phnJoc1/phnJoc2</i>	78
4.7.2 Detektion eines <i>phnJ</i> -Genfragments in <i>Oceanobacillus iheyensis</i> , A17:32 und NM:5 mit dem Primerpaar <i>phnJoc1/phnJoc2</i>	80
4.7.3 Nachweis von <i>phnJ</i> -Genfragmenten mit dem Primerpaar <i>phnJoc1</i> und <i>phnJoc2</i> im Boden	80
5. Diskussion	88
5.1 Einfluss von Glyphosat auf die Bodenmikroflora.....	88
5.2 Vorkommen von glyphosatabbauenden Bakterien	90
5.2.1 Glyphosatabbaufähigkeit der Bodenisolate.....	90
5.2.2 Verwendung des C-P-Lyaseweges.....	92
5.3 Metagenombank aus dem Boden NM nach Glyphosatapplikation	94
5.3.1 Generierung der Metagenombank	94
5.3.2 Diversität der Metagenombank	97
5.3.3 Phylogenetische Charakterisierung der Metagenombank	99
5.3.4 Auffinden eines Glyphosat abbauenden Klons in der Metagenombank.....	99
5.4 Genetisches Potenzial zum Glyphosatabbau in Bodenproben von A17 und NM.....	102
5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick	105
6. Zusammenfassung	107

7. Literaturverzeichnis.....	109
8. Anhang	126

II. Abkürzungsverzeichnis

α	alpha (Untergruppe der Proteobakterien)
A	Adenin/Ampere
A17	Boden aus Scheyern, Schlag A17
Abb.	Abbildung
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
AS	Aminosäure
β	beta (Untergruppe der Proteobakterien)
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
CH₄	Methan
Chl	Chloramphenicol
CIP	Calf intestine alkaline phosphatase
CO₂	Kohlendioxid
COG	Cluster of orthologous groups
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
δ	delta (Untergruppe der Proteobakterien)
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F	Farad
FACS	fluorescence activated cell sorting
γ	gamma (Untergruppe der Proteobakterien)
g	Gramm
G	Guanin
Gly	Glyphosat
h	Stunde(n)/hekto
H₂O_{dd}	bidestilliertes Wasser
HMW	high molecular weight (hochmolekulare)

HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
INT	Iodonitrotetrazoliumviolett
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LB^{chl}	Luria-Bertani-Medium mit Chloramphenicol
μ	Mikro /Mittelwert
M	Mega/Molar (mol/l)/
m	Milli
Min.	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NM	Boden aus Neumarkt (Oberpfalz)
N₂O	Distickstoffoxid (Lachgas)
Ω	Ohm
ORF	open reading frame
p	Piko
P	Phosphor/Phosphat
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
rDNS	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen
RNS	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rRNS	ribosomale RNS
RT	Raumtemperatur/reverse Transkription
σ	Standardabweichung
SIGEX	substrate induced gene expression screening
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sek.	Sekunden
SIP	stable isotope probing
SSC	Saline sodium citrate
Tab.	Tabelle
TAE	Trisazetat-EDTA Elektrophoresepuffer
TBE	Trisborat-EDTA Elektrophoresepuffer
T	Thymidin

TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt
WHK	Wasserhaltekapazität
YAC	Yeast Artificial Chromosome

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vorgehensweise beim Erstellen einer Metagenombank.....	7
Abb. 2: Genkarte von pBeloBAC11	9
Abb. 3: Strukturformel von Glyphosat (N-Phosphonomethylglycin)	13
Abb. 4: <i>phn</i> -Operon in <i>E. coli</i>	15
Abb. 5: Abbauwege von Glyphosat im Boden	17
Abb. 6: Schematische Darstellung der verwendeten Mikrokosmen.....	21
Abb. 7: Karte des Vektors pCR [®] 2.1	31
Abb. 8: Versuchsdesign INT-Test	43
Abb. 9: Verlauf der Gasemissionen (CO ₂ , N ₂ O, CH ₄) der Mikrokosmen befüllt mit Boden aus Scheyern (A17) und Neumarkt (NM)	49
Abb. 10: Aufgereinigte 16S-rRNS-Genfragmente ausgewählter Isolate	51
Abb. 11: 16S-rRNS-Genamplifikate der Isolate A17 und NM nach Doppelverdau mit <i>AluI</i> und <i>MspI</i>	51
Abb. 12: Phylogenetischer Stammbaum der zur Primerkonstruktion verwendeten <i>phnJ</i> -Sequenzen.....	57
Abb. 13: Agarosegel des PCR-Produkts von <i>phnJ</i> , P: Positivkontrolle (<i>Oceanobacillus iheyensis</i>), N: Negativkontrolle, M: 1 kb DNS Marker	59
Abb. 14: Agarosegel der PCR-Produkte von <i>phnJ</i> der Bodenisolates	60
Abb. 15: Phylogenetischer Stammbaum der 16S-rRNS-Genfragmente der wichtigsten Isolate des kultivierungabhängigen Ansatzes	61
Abb. 16: Schematische Vorgehensweise bei der Erstellung und Durchsuchung der Metagenombank	62
Abb. 17: Ränder eines Pulsfeldgels mit hochmolekularer DNS	63
Abb. 18: Pulsfeldgel nach Restriktionsverdau gleicher Mengen HMW-DNS	64
Abb. 19: Agarosegel des aufgereinigten und mit <i>HindIII</i> verdauten Vektors pBeloBAC11 ..	65
Abb. 20: Pulsfeldgel mit DNS-Fragmenten ausgewählter Klone der Metagenombank nach Restriktion mit <i>HindIII</i>	65
Abb. 21: Verteilung der Insertgrößen der Metagenombank (n = 110).....	66
Abb. 22: Verteilung der Sequenzen im Endsequenzierungsansatz der Metagenombank auf Basis ihrer G + C-Verhältnisse	67
Abb. 23: Zuordnung der Sequenzen mit signifikanten Ähnlichkeiten (e-Werten < e ⁻¹⁵) zu ihrem phylogenetischen Ursprung.....	68
Abb. 24: Agarosegel der PCR-Produkte mit dem Primerpaar <i>phnJ1</i> / <i>phnJ2</i> ; jeweils zehn rekombinante Plasmide (potenziell positive Klone der Metagenombank) gepoolt ..	75
Abb. 25: Agarosegel der PCR-Produkte mit dem Primerpaar <i>phnJ1</i> / <i>phnJ2</i> (vereinzelte Klone).....	75
Abb. 26: Phylogenetischer Stammbaum bekannter <i>PhnJ</i> -Aminosäuresequenzen	76
Abb. 27: Agarosegele der PCR-Produkte von <i>phnJ</i>	80
Abb. 28: Agarosegel der PCR-Produkte von <i>phnJ</i> mit dem Primerpaar <i>phnJoc1</i> / <i>phnJoc2</i>	81
Abb. 29: Rarefactionkurven: Anzahl an unterschiedlichen bakteriellen <i>phnJ</i> - und <i>PhnJ</i> -Sequenzen aufgetragen als Funktion der Anzahl an Klonen	85
Abb. 30: Phylogenetischer Stammbaum: Verwandtschaft der bakteriellen <i>PhnJ</i> -Sequenzen aller untersuchten Habitate und der Referenzorganismen der Datenbank	86

IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Kenndaten der Oberböden (Ap) der untersuchten Agrarstandorte Scheyern und Neumarkt.....	20
Tab. 2: Verwendete Mikroorganismen.....	23
Tab. 3: Verwendeter <i>Escherichia coli</i> Stamm.....	23
Tab. 4: Verwendete Plasmide.....	24
Tab. 5: Verwendete Oligonukleotid-Primer.....	28
Tab. 6: Ergebnisse der Sequenzierungen der 16S-rRNS-Genamplifikate	52
Tab. 7: Wachstum der Isolate in Flüssigkultur mit Glyphosat (0,5 mM bzw. 1,5 mM) als einziger P-Quelle	53
Tab. 8: Ergebnisse des INT-Tests der Bodenisolat.....	55
Tab. 9: Glyphosatkonzentration und Abnahme nach Inkubation ausgewählter Isolate und der Kontrollstämm.....	56
Tab. 10: PCR-Fragmente nach der virtuellen PCR mit dem Primerpaar phnJ1/phnJ2.....	58
Tab. 11: Identifizierung potenzieller bakterieller unbekannter Genomfragmente der Metagenombank.....	69
Tab. 12: Statistische Auswertung des Endsequenzierungsansatzes der Metagenombank	70
Tab. 13: Zuordnung der Sequenzen des Endsequenzierungsansatzes zu COG-Kategorien ...	72
Tab. 14: Ergebnisse im Wachstums- und INT-Test ausgewählter Klone der Metagenombank	74
Tab. 15: Glyphosatkonzentration und Abnahme nach Inkubation ausgewählter Klone der Metagenombank.....	77
Tab. 16: Ergebnisse der virtuellen PCR mit dem Primerpaar phnJoc1/phnJoc2	79
Tab. 17: Ergebnis der Sequenzierung von je 40 zufällig ausgewählten Klonen vom Standort Scheyern (A17).....	82
Tab. 18: Ergebnis der Sequenzierung von je 40 zufällig ausgewählten Klonen vom Standort Neumarkt (NM)	83

1. Einleitung und Problemstellung

In den letzten Jahren ist der Einsatz von Herbiziden in der Landwirtschaft stetig gestiegen. Glyphosat (N-Phosphonomethylglycin) als Wirkstoff des Totalherbizids Roundup® ist dabei das am meisten verwendete Herbizid weltweit. Es wird standardmäßig zur Unkrautbekämpfung in der Landwirtschaft, aber auch im Gartenbau und in Städten angewandt. Seine Verwendung hat sich beispielsweise in den Jahren 1992 bis 2002 versechsfacht. Damit wurde Glyphosat noch häufiger eingesetzt besonders in den Vereinigten Staaten (Gianessi und Reigner, 2006). Der Hauptgrund für diesen Anstieg liegt in der Entwicklung von glyphosatresistenten Kulturpflanzen wie Soja (*Glyzine max*) oder Raps (*Brassica napus*). Allein in den Vereinigten Staaten wurden im Jahre 2004 ca. 30 Millionen Hektar mit glyphosatresistentem Soja bepflanzt (Cerdeira und Duke, 2006). Der kombinierte Einsatz von gentechnisch veränderten Kulturpflanzen und Glyphosat wird zukünftig wahrscheinlich zunehmen. Gleichzeitig werden sich Unkräuter mit natürlichen Resistenzen gegenüber dem Herbizid auf den Feldern ausbreiten und sich neue Resistenzen entwickeln.

Das Totalherbizid Glyphosat wird im Boden mikrobiell abgebaut. Zahlreiche Bakterien wurden bereits kultiviert, die Glyphosat unter Phosphatmangelbedingungen als Phosphatquelle verwenden können. Man vermutet, dass es zwei mikrobiell katalysierte Hauptabbauwege für Glyphosat in der Natur gibt, bei denen C-P-Lyasen eine wichtige Rolle spielen. Über die biomolekularen Grundlagen des Abbaus ist aber kaum etwas bekannt. Dies liegt vor allem auch daran, dass mehr als 99 % der Mikroorganismen, die in natürlichen Habitaten vorkommen, bislang nicht kultivierbar sind (Amann *et al.*, 1995). Um die Schwierigkeiten und Limitationen, die mit der Kultivierung von Mikroorganismen verbunden sind, zu umgehen, wurden verschiedene kultivierungsunabhängige Methoden entwickelt. Eine innovative Methode ist die so genannte „Metagenomik“, die versucht komplexe Genome aus mikrobiellen Nischen zu erfassen (Streit und Schmitz, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um auch Gene von bislang nicht kultivierbaren Organismen, die am Abbau von Glyphosat beteiligt sind, identifizieren und eventuell bisher unbekannte Abbauwege des Herbizids entdecken zu können.

Glyphosat bindet im Boden normalerweise schnell an Bodenpartikeln. Die Adsorption von Glyphosat an Bodenpartikel beeinflusst die Bioverfügbarkeit und den Abbau des Herbizids. Neuere Arbeiten zeigen aber, dass sich Glyphosat von Bodenpartikeln wieder lösen kann

(Cerdeira und Duke, 2006). Eine Verlagerung ins Grundwasser kann somit nicht ausgeschlossen werden. Der Abbau von Glyphosat im Boden ist vom Bodentyp abhängig. Halbwertszeiten von einigen Tagen bis zu mehreren Monaten und Jahren wurden festgestellt (Torstensson, 1985). Um einer mögliche Gefährdung des Grundwassers durch das Herbizid Glyphosat vorzubeugen, ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, Grundlagen für ein biotechnologisches „on-site“-Verfahren zu entwickeln. Dadurch soll es ermöglicht werden, den Wirkstoff, sobald er in den Boden eingedrungen ist, schnellst möglich abzubauen. Entsprechende Gene, die in der Lage sind, das Herbizid effizient zu metabolisieren, müssen zu diesem Zweck in Böden detektiert und charakterisiert werden. Der Fremdstoffabbau im Boden kann direkt nach der Applikation eingeleitet werden, da Glyphosat über die Blätter und nicht über die Wurzel aufgenommen wird.

Im Mittelpunkt des Interesses der vorliegenden Arbeit steht die Charakterisierung von C-P-Lyase kodierenden Genen in zwei unterschiedlichen Ackerböden (schluffig versus sandig; mit einem unterschiedlichen Gehalt an organischer Substanz). Phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass homologe Gene für den C-P-Lyaseabbauweg in entfernt verwandten Bakterienspezies vorkommen. Die *phn*-Gencluster unterscheiden sich strukturell, funktional und in ihrem Aufbau innerhalb verschiedener bakterieller Spezies. Doch alle enthalten die Gene *phnG* – *phnM*, die essentiell für die Spaltung der Kohlenstoff-Phosphor-Verbindung sind (Huang *et al.*, 2005). Auch Glyphosat enthält eine solche C-P-Bindung. Zumal die *phnJ*-Gene einzelner Spezies bereits nachgewiesen werden konnten, wurde in der vorliegenden Arbeit darauf fokussiert, *phnJ*-Gene über Speziesgrenzen hinweg im Boden zu detektieren.

In der vorliegenden Arbeit war ein Modellversuch die Basis für ein Kultivierungsverfahren und einem kultivierungsunabhängigen analytischen Ansatz vorangestellt. Mikrokosmen wurden dazu mit zwei unterschiedlich bewirtschafteten Böden verschiedener Textur befüllt und mit Glyphosat beaufschlagt. Als Indikator für die mikrobielle Aktivität wurde während des gesamten Versuchsverlaufs die Emission der Spurengase Kohlendioxid, Lachgas und Methan gemessen. Der Modellversuch zielte zum einen darauf ab, eine eventuelle Beeinflussung mikrobieller Prozesse durch die Aufbringung von Glyphosat festzustellen. Zum anderen wurden damit selektive Bedingungen geschaffen, um Organismen, die am Abbau der Substanz beteiligt sind, anzureichern und Probenmaterial für die kultivierungsabhängigen und die kultivierungsunabhängigen Analysen zu generieren.

Der kultivierungsabhängige Teil der vorliegenden Arbeit zielte darauf ab, Bakterien aus den beiden Böden zu isolieren, die in der Lage waren, Glyphosat abzubauen. Das Spektrum bereits bekannter zum Glyphosatabbau befähigter Bakterien sollte eventuell erweitert werden. Zudem sollten die bakteriellen Isolate in Bezug auf ihre Glyphosatabbaufähigkeit charakterisiert werden. Gene, die für den Abbau von Glyphosat in diesen Isolaten verantwortlich waren, sollten nachgewiesen werden.

Der kultivierungsunabhängige Teil bestand zum einen in der Konstruktion einer Metagenombank aus dem konventionell bewirtschafteten sandigen Boden. Diese Metagenombank sollte charakterisiert werden und nach Genen untersucht werden, die am Abbau von Glyphosat im Boden beteiligt waren. Dieser Ansatz wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Zum anderen sollten in dem integriert bewirtschafteten schluffigen und dem konventionell bewirtschafteten sandigen Boden C-P-Lyase kodierende Gene (*phnJ*-Gene) aus mikrobiellen Gemeinschaften nachgewiesen und die Beeinflussung ihrer Diversität durch Glyphosat aufgezeigt werden.

2. Stand des Wissens und Zielsetzung

2.1 Mikrobielle Leistung und Qualität von Böden

Böden sind in Bezug auf die Diversität der Bodenmikroorganismen eines der interessantesten Ökosysteme auf der Erde. Schätzungsweise 4000 - 10000 verschiedene prokaryotische Genome befinden sich in einem Gramm Oberboden (Torsvik *et al.*, 1990; Torsvik *et al.*, 1996).

Diese Biodiversität ist ein wesentlicher Faktor der Bodenfruchtbarkeit, wobei die Funktionen der Mikroorganismen nicht nur für das Pflanzenwachstum, sondern auch für den Abbau von Agrochemikalien wichtig sind. Pestizide werden weltweit vor allem in der Nahrungsmittelproduktion eingesetzt. Sie helfen, die Versorgung einer stetig wachsenden Weltbevölkerung zu gewährleisten und sind heute aus der modernen Landwirtschaft nicht wegzudenken. Dennoch begrenzen die Auswirkungen auf die Umwelt und die Gesundheit des Menschen ihren übermäßigen Einsatz. Daher ist das Verständnis über die Auswirkungen von Pestiziden im Boden sehr wichtig für die Einschätzung ihres sicheren Gebrauchs und ihres Umweltverhaltens. Um mögliche Umweltauswirkungen abschätzen zu können, ist zudem das chemische Verhalten bzw. das Zusammenspiel von Adsorption und Abbau sehr wichtig.

Pestizide können sich auch durch wiederholte Applikation im Boden akkumulieren. Die Kontamination von Böden durch die Verwendung großer Mengen an Pestiziden bei der Bewirtschaftung oder bei der unbeabsichtigten Freisetzung kann zu einer Kontamination des Bodens und des Grundwassers führen. Zudem ist zukünftig mit einem Anstieg der Applikation von Pestiziden durch die Kombination pestizidresistenter Kulturpflanzen und der entsprechenden Komplementärpestizide zu rechnen. Bodenmikroorganismen sind zum Abbau einer Vielzahl unterschiedlicher Pestizide im Boden befähigt. Die Bioremediation kann einen wichtigen Beitrag leisten, kontaminierte Ökosysteme zu dekontaminieren. Unter Bioremediation versteht man in diesem Zusammenhang den gezielten Einsatz von Mikroorganismen und das Unterstützen deren Aktivität zur Beseitigung von Kontaminationen.

2.2 Auf der Suche nach mikrobiellen Funktionen

Mikrobielle Funktionen in Böden können mit Kultivierungsverfahren und kultivierungsunabhängigen Methoden erforscht werden. Kultivierungsabhängige Methoden beschränken sich dabei weitgehend auf den Anteil bislang kultivierbarer Mikroorganismen, die nur einen kleinen Anteil an der Gesamtpopulation ausmachen, da derzeit nur etwa 0,1 – 0,2 % der Bodenmikroorganismen kultivierbar sind (Amann *et al.*, 1995). Mit kultivierungsunabhängigen Methoden kann ein größerer Anteil der Gesamtpopulation von Bodenmikroorganismen erfasst werden.

2.2.1 Kultivierungsabhängige Techniken

Ribosomale RNS Analysen zeigen, dass in fast allen prokaryotischen Gruppen bislang nicht-kultivierte Mikroorganismen vorhanden sind. Für zahlreiche Gruppen sind keine kultivierbaren Vertreter bekannt (Kaeberlein *et al.*, 2002). Die Gründe dafür, dass eine so große Anzahl an Mikroorganismen auf synthetischem Medium in Reinkultur nicht isoliert werden kann, sind vielfältig. Zum einen müssen die Mikroorganismen mit den chemischen Komponenten ihrer natürlichen Umwelt versorgt werden. Diese sind aber oftmals nicht bekannt. Zum anderen entspricht der hohe Nährstoffgehalt künstlicher Medien nicht den tatsächlichen oligotrophen Bedingungen im Boden. Durch Verdünnung der Nährstofflösungen kann die Anzahl kultivierbarer Bodenmikroorganismen erhöht werden (Janssen *et al.*, 2002). Zudem können Mikroorganismen Signalmoleküle aus ihrer Umgebung benötigen, die ihnen eine vertraute Umwelt anzeigen (Bruns *et al.*, 2002). Für diese Hypothese spricht, dass Mikroorganismen auch dann nicht wachsen, wenn ihnen die benötigten Nährstoffe zur

Verfügung stehen (Kaeberlein *et al.*, 2002). Durch die Anwendung innovativer Techniken wie Diffusionskammern, die eine natürliche Umwelt simulieren, konnten beispielsweise bislang nicht-kultivierbare marine Mikroorganismen isoliert werden (Kaeberlein *et al.* 2002). Der Vorteil eines kultivierungsabhängigen Ansatzes besteht darin, dass mikrobielle Funktionen direkt mit einem bestimmten Mikroorganismus in Verbindung gebracht werden können.

Der Abbau von Pestiziden wie Acetochlor, Chlorpyrifos, Hexazinon, und Oxadiazon durch Bodenmikroorganismen kann beispielsweise durch die Verwendung des Pestizids als einzige P- oder C-Quelle, durch die Verringerung der eingesetzten Pestizidkonzentration und den Nachweis von Abbauprodukten belegt werden (Garbi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2005). Zu diesem Zweck werden häufig radioaktiv-markierte Pestizide eingesetzt (Crawford *et al.*, 1998; El Sebai *et al.*, 2004). Da kultivierungsabhängige Methoden sehr selektiv sind, muss die Bedeutung der isolierten Mikroorganismen und ihrer Funktionen für das Ökosystem zusätzlich untersucht werden.

2.2.2 Kultivierungsunabhängige Techniken

Molekularbiologische Techniken zum Nachweis von Bakterien in Bodenproben, die auf der Extraktion von DNS aus dem Boden basieren, sind von der Kultivierbarkeit von Bodenbakterien unabhängig. Probleme ergeben sich bei diesen Methoden durch die Lyse bakterieller Zellwände, die Extraktion intakter extrazellulärer Nukleinsäuren und die Koextraktion von Substanzen wie Huminstoffe. Diese Huminstoffe können nachfolgende enzymatische Reaktionen wie die Polymeraseaktivität in der PCR und den Restriktionsverdau inhibieren (Cullen und Hirsch, 1998). Im Folgenden werden einige kultivierungsunabhängige Techniken vorgestellt.

2.2.2.1 Shotgun-Sequenzierungen

Um Shotgun-Sequenzierungen durchführen zu können, wird hochmolekulare DNS zunächst fragmentiert, der Größe nach aufgetrennt und in einen geeigneten Vektor kloniert. Diese Klone werden anschließend ausgehend von beiden Enden sequenziert. Auf diese Weise erhält man mehrfach überlappende Sequenzen, die zu zusammengehörenden Sequenzen zusammengefügt werden. Durch Shotgun-Sequenzierungen wurden bisher zahlreiche Genome vollständig sequenziert (Doolittle, 2002). Aber auch aus Umweltproben gewonnene DNS-Sequenzen wurden auf diese Weise analysiert, um repräsentative Sequenzen von unterschied-

lichen Mikroorganismen gleichzeitig zu erhalten (Venter *et al.*, 2004). Dabei sind häufig vorkommende Spezies mit zahlreichen Sequenzen, unterrepräsentierte Spezies hingegen mit wenigen Sequenzen vertreten (Venter *et al.*, 2004). Tyson *et al.* (2004) sequenzierten die DNS eines Biofilms einer Säuremine mit 76,2 Mbp fast vollständig. Auch im bisher größten Sequenzierungsansatz wurden 1045 Milliarden Basenpaare von DNS aus der Sargasso-See mit Hilfe dieser Methode analysiert (Venter *et al.*, 2004).

2.2.2.2 Einsatz von degenerierten Primern

Eine weitere kultivierungsunabhängige Methode basiert auf degenerierten Primern. Bei dieser Methode werden degenerierte Primer auf der Basis von publizierten Sequenzen konstruiert und in der PCR eingesetzt. Die Ziel-DNS stammt aus Umweltproben. Mit Hilfe dieses Ansatzes werden funktionelle Gene detektiert und die Häufigkeit und die Diversität bestimmter Gene in Umweltproben untersucht. Dabei können wichtige Daten bezüglich der Ökologie und der Evolution der untersuchten Gene gewonnen werden. Aussagen über die Verbreitung der untersuchten Gene in den mikrobiellen Gemeinschaften im Boden können getroffen werden. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass Sequenzinformationen über die zu untersuchenden Gene vorliegen müssen. Es stehen zwar immer mehr vollständig sequenzierte mikrobielle Genome zur Verfügung, diese stammen aber vor allem von kultivierbaren Mikroorganismen. Auch werden meist funktionelle Gene bekannter Genfamilien und nicht völlig neue Gene identifiziert, da die degenerierten Primer aus konservierten Genregionen stammen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch die DNS bislang nicht kultivierbarer Mikroorganismen erfasst wird. Dieser Ansatz birgt auch das Potenzial homologe Gene aus Mikroorganismen zu identifizieren, die bislang mit dieser Funktion nicht in Zusammenhang gebracht wurden. Neue Gensequenzen mit Homologien zu bekannten Genen werden in diesem Ansatz detektiert (Eschenfeldt *et al.*, 2001; Guardabassi und Agerso, 2006).

2.2.2.3 Metagenombanken

Ein relativ neuer Ansatz, der sich auf bislang nicht kultivierbare Mikroorganismen richtet, ist der Metagenomansatz. Durch Metagenombanken kann ein Einblick in das genomische Potential und die ökologische Rolle kultivierbarer und nicht kultivierbarer Mikroorganismen gewährt werden (Streit und Schmitz, 2004). Darüber hinaus dienen sie als wertvolle Quelle für weitere Sequenzanalysen und biochemische Experimente (DeLong, 2005). Unter einem

Metagenom versteht man die kollektiven Genome aller Mikroorganismen in einem gegebenen Habitat (Lorenz *et al.*, 2002a). Eine Metagenomanalyse umfasst die Isolierung von DNS aus einer Umweltprobe, die Klonierung dieser DNS in einen geeigneten Vektor, die Transformation des Vektors in ein Wirtsbakterium und das Screening der erhaltenen Transformanten (Abb. 1). Durch den Metagenomansatz versucht man Gene in verschiedenen Umwelten zu identifizieren und ihre Funktionen und Interaktionen aufzuzeigen (Wexler *et al.*, 2005). Außerdem gewährt dieser Ansatz einen Zugang zu den Genomen von bislang nicht kultivierbaren Mikroorganismen. Diese stellen häufig den Hauptanteil von natürlich vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaften dar (Béjà *et al.*, 2000). Pace *et al.* (1985) schlugen die direkte Klonierung von DNS einer Umweltprobe vor. DeLongs Gruppe legte den Grundstein, indem sie eine Metagenombank von Prokaryoten aus Meerwasser konstruierte (Stein *et al.*, 1996). Dabei wurde ein 16S-rRNS Gen identifiziert, das von einem bislang nicht kultivierbaren Archaeon stammte.

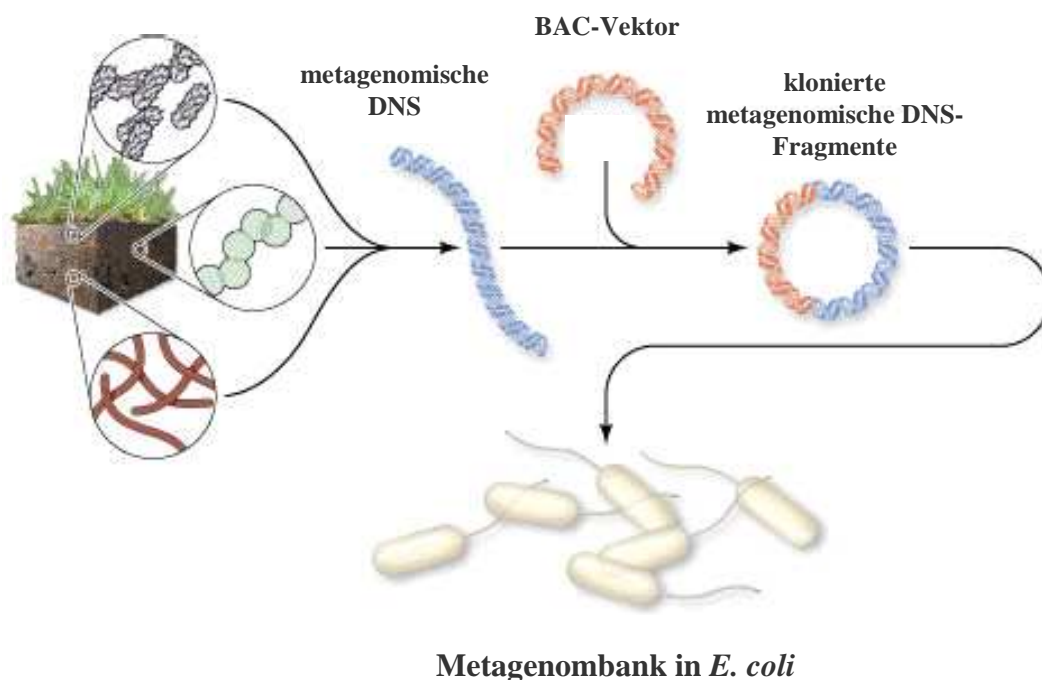


Abb. 1: Vorgehensweise beim Erstellen einer Metagenombank (modifiziert, Autor unbekannt)

Als Umweltproben zum Erstellen einer Metagenombank wurden unter anderem Boden (Rondon *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2004), Flusswasser (Cottrell *et al.*, 2005), Meerwasser (Béjà *et al.*, 2000; Venter *et al.*, 2004), die Rumenmikroflora einer Milchkuh (Ferrer *et al.*, 2005), anaerobe Bakterien aus einer Kläranlage (Wexler *et al.*, 2005) und ein Biofilm aus dem Entwässerungssystem einer Säuremine (Tyson *et al.*, 2004) verwendet. Dabei ist die Isolierung

von hochmolekularer DNS aus dem Boden häufig schwierig, da polyphenolische Verbindungen mitextrahiert werden, an Nukleinsäuren binden und enzymatische Reaktionen behindern (Young *et al.*, 1993).

Aus den Umweltproben wird die DNS zur Konstruktion einer Metagenombank entweder durch direkte Lyse gewonnen (Henne *et al.*, 1999), oder ein Anreicherungsschritt wird der Lyse vorangestellt (Knietsch *et al.*, 2003). Der Vorteil der direkten Lyse liegt darin, dass sowohl kultivierbare als auch bisher nicht kultivierbare Bakterien erfasst werden. Die vorangestellte Anreicherung hingegen erhöht die Wahrscheinlichkeit im Screening einen gewünschten Kandidaten zu identifizieren. Allerdings werden Bakterien, die mit den bis dato bekannten Techniken nicht isolierbar sind, in diesem Ansatz nicht erfasst. Für die Detektion von biotechnologisch interessanten Enzymen wie Amidasen, Agarasen, Koenzym B₁₂-abhängigen Dehydratasen und Alkoholoxidoreduktasen hat sich dieser Ansatz bewährt (Daniel, 2005).

2.2.2.3.1 Klonierungsvektoren

Neben Cosmid-Vektoren werden BAC-Vektoren (Bacterial Artificial Chromosome) am häufigsten zum Erstellen einer Metagenombank verwendet. Der Vektor pBeloBAC11 (Abb. 2) wurde von Shizuya *et al.* (1992) entwickelt. Er repräsentiert die zweite Generation an BAC-Vektoren, die bereits ein *lacZ*-Gen enthalten und dadurch ein blau-weiß-Screening ermöglichen. Das Plasmid basiert auf dem F-Faktor Replikon von *E. coli*. Die Gene *parA*, *parB* und *parC* gewährleisten die exakte Aufteilung des Plasmids während der Teilung des Bakterienwirts. Die geringe Kopienzahl von einer bis zwei Kopien pro Zelle bedingt die Stabilität der geklonten DNS und verringert das Rekombinationspotential der DNS-Fragmente. YAC-Plasmide (Yeast Artificial Chromosome) können zu einem hohen Prozentsatz (32 %) instabile Klone ausbilden (Schmidt *et al.*, 1994). Chimäre Klone können ein Drittel (Libert *et al.*, 1993) bis 60 % (Green *et al.*, 1991) aller Klone bilden. Diese chimären YACs kommen entweder durch Rekombinationsereignisse während der Transformation oder durch die gemeinsame Klonierung nicht zusammengehörender DNS-Fragmente zustande. Während YAC-Plasmide Inserts bis zu einer Größe von 2 Mb integrieren können, beträgt das bislang größte publizierte Insert eines BAC-Klons 725 kb (Zimmer und Gibbins, 1997). Fosmid- und Cosmid-Vektoren hingegen verpacken stabil DNS-Fragmente nur bis zu einer Größe von etwa 40 kb (Daniel, 2005). Diese Vektoren und BACs sind im Gegensatz zu YACs leicht handhabbar. Molekularbiologische Standard-

techniken können problemlos angewendet werden (Osoegawa *et al.*, 1998).

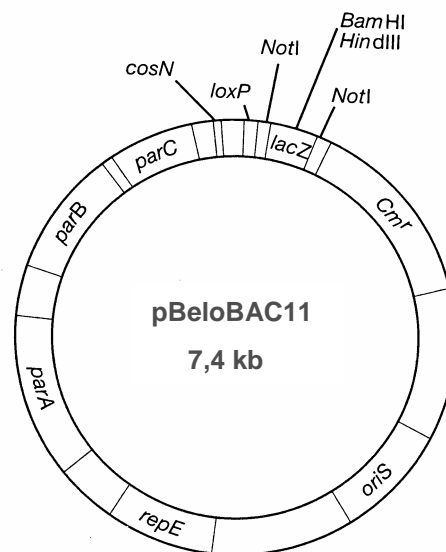


Abb. 2: Genkarte von pBeloBAC11, Cmr: Chloramphenicolresistenz (Sambrook und Russell, 2001)

2.2.2.3.2 Screening von Metagenombanken

Metagenombanken können auf verschiedene Weise nach gewünschten Klonen durchsucht werden. Ein möglicher Ansatz ist die Sequenzanalyse. Beispielsweise können die Klone einer Metagenombank zunächst nach phylogenetischen Markern wie 16S-rRNS-Genen durchsucht werden. Dadurch können Rückschlüsse auf den möglichen taxonomischen Ursprung der DNS des entsprechenden Klons gezogen werden. Durch die vollständige Sequenzierung des jeweiligen Klons können weitere Gene detektiert werden. Bèjà *et al.* (2000) identifizierten einen Klon, der ein 16S-rRNS-Gen eines γ -Proteobakteriums aus dem Meer enthält. In der flankierenden Region dieses Gens konnte ein bakteriorhodopsin-ähnliches Gen festgestellt werden. Der Nachweis des Genproduktes zeigte, dass es sich tatsächlich um einen Photorezeptor handelte. Bakteriorhodopsingene kommen folglich nicht ausschließlich in Archaeen vor, sondern sind auch unter Proteobakterien des Meeres weit verbreitet. Dieser Ansatz kann auch dazu benutzt werden, Sequenzinformationen von Bakterien zu generieren, über die wenig bekannt ist. Die Sequenzierung von Klonen aus Metagenombanken, die dem *Acidobacteria*-Phylum zugerechnet werden konnten, lieferte bisher ca. 500 kb Sequenzinformation. Diese kann einen Einblick in Untergruppen dieses Phylums gewähren, die bisher nicht kultiviert wurden (Liles *et al.*, 2003; Quaiser *et al.*, 2003).

Eine weitere Möglichkeit der Sequenzanalyse besteht in der Sequenzierung der Insertenden von zufällig ausgewählten Klonen einer Metagenombank. Wird ein interessantes Gen auf

diese Weise identifiziert, kann die flankierende DNS-Region nach phylogenetischen Markern durchsucht werden (Handelsman, 2004). Wird eine sehr große Anzahl an Klonen einer Metagenombank sequenziert (Tyson *et al.*, 2004; Venter *et al.*, 2004), können phylogenetische mit funktionellen Aussagen verknüpft werden. Dies erlaubt Rückschlüsse, wie häufig bestimmte Gentyphen vorkommen, und Genome von bislang nicht kultivierbaren Organismen lassen sich auf diese Weise rekonstruieren (Handelsman, 2004). Tyson *et al.* (2004) sequenzierten das Metagenom eines Biofilms aus einer Säuremine fast vollständig. Dabei konnten zwei fast vollständige Genome (*Leptospirillum* Gruppe II; *Ferroplasma* Typ II) rekonstruiert werden. Interessanterweise wurden Gene, die Ähnlichkeiten mit Genen der Stickstofffixierung aufwiesen, in einem Organismus identifiziert, der in der Biofilmgemeinschaft nur in sehr geringer Anzahl vorhanden war. Venter *et al.* (2004) konnten zeigen, dass viele Genome aus der Sargasso-See Gene enthielten, die Ähnlichkeiten mit Genen der Phosphonataufnahme und der Nutzung von Polyphosphaten hatten. Phosphonate und Polyphosphate kommen in diesem extrem phosphatlimitierten Ökosystem vor. Die Bedeutung des Metagenomansatzes lässt sich dadurch erkennen, dass die Anzahl an publizierten Metagenomsequenzen allein im Jahr 2004 etwa 900 Mb betrug (Streit und Schmitz, 2004).

Eine weitere Möglichkeit eines genetischen, aber zunächst sequenzierungsunabhängigen Screenings, ist der Einsatz degenerierter Primer, um in einer Metagenombank gewünschte Gene durch PCR (Ginolhac *et al.*, 2004) oder Hybridisierung (Knietsch *et al.*, 2003) nachzuweisen. Der Vorteil dieses Screenings, liegt darin, dass es unabhängig von der heterologen Genexpression ist. Der Nachteil besteht darin, dass Sequenzinformationen über die gesuchten Gene vorliegen müssen. Primer und Sonden werden aus konservierten Regionen konstruiert. Mit diesem Ansatz können meist nur neue Mitglieder bekannter Genfamilien identifiziert werden (Daniel, 2005). Enthält in einer Metagenombank ein Insert eines Klons das gewünschte Gen, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass das ganze Gen in diesem Insert enthalten ist (Daniel, 2005).

In einem alternativen Ansatz werden interessante Klone dadurch identifiziert, dass sie eine bestimmte Funktion exprimieren. Dies erfordert die erfolgreiche Transkription und Translation eines oder mehrerer Gene und gegebenenfalls die Sekretion der Genprodukte im entsprechenden Wirt. Dieser Ansatz ist der einzige, der völlig neue Genklassen für bekannte oder neue Funktionen identifizieren kann, da die gesuchten Gene nicht aufgrund ihrer Sequenz erkannt werden. Dabei bleibt die heterologe Genexpression die größte Barriere

dieses Ansatzes. Viele, möglicherweise die meisten Gene werden im Wirtsbakterium nicht exprimiert (Handelsman, 2004). Dennoch wurden durch funktionelle Analyse bereits neue Antibiotika wie Turbomycin A und B (Gillespie *et al.*, 2002), Antibiotikaresistenzgene gegen Tetracyclin (Diaz-Torres *et al.*, 2003), Na⁺ (Li⁺)/H⁺ Transporter (Majernik *et al.*, 2001), lipolytische Enzyme (Henne *et al.*, 2000) und Gene, die für den Abbau von 4-Hydroxybutyrat kodieren, identifiziert. Die meisten Biomoleküle, die durch ein funktionelles Screening entdeckt wurden, sind schwach oder gar nicht mit bekannten Genen verwandt (Daniel, 2005). Die Frequenz von Klonen einer Metagenombank, die eine bestimmte Aktivität zeigen, ist niedrig. In einer Metagenombank eines nordamerikanischen Bodens zeigten 29 der 24576 Klone hämolytische Aktivität (Rondon *et al.*, 2000). Deshalb müssen effiziente Screeningmethoden entwickelt werden.

Alternativ können Genombanken auch mit c-DNS konstruiert werden (Daniel, 2005). Der Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass jedes nachgewiesene Gen auch funktional ist. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verknüpfung von Metagenombanken mit Microarrays. In diesem Ansatz werden nur die Gene identifiziert, die auch transkribiert werden und die relevant für ein Ökosystem sind (Streit und Schmitz, 2004). Ein weiterer Screeningansatz wurde von Uchiyama *et al.* (2005) beschrieben. Im „substrate induced gene expression screening“ (SIGEX) wird die Metagenombank in einem gfp-Expressionsvektor konstruiert. Da die katabole Genexpression normalerweise durch Substrate induziert wird und durch benachbarte Regulationselemente kontrolliert wird, können positive Klone in Flüssigkultur durch FACS („fluorescence activated cell sorting“) identifiziert werden. Auch die Kombination von SIP („stable isotope probing“) mit Metagenomik ist viel versprechend (Dumont und Murrell, 2005). In dieser Methode wird eine mikrobielle Gemeinschaft mit einem ¹³C-markierten Substrat angezogen. Anschließend wird die ¹³C-markierte DNS isoliert. Mit dieser DNS kann eine Metagenombank erstellt werden. Alle Gene, die in einem anschließenden Screening detektiert werden, stammen von Mikroorganismen, die das Substrat auch nutzen konnten.

Trotz der hohen Kosten und des hohen Zeit- und Arbeitsaufwands birgt Metagenomik ein sehr großes Potenzial für die Entdeckung neuer Gene.

2.3 Phosphonat-Pestizide

In Phosphonatverbindungen ist ein Kohlenstoffatom kovalent an ein Phosphoratom gebunden. Diese stabile C-P-Verbindung ist resistent gegenüber chemischer Hydrolyse, thermischer Zersetzung und Photolyse (Moore *et al.*, 1983). Phosphonate kommen in der Natur als Phospholipidanaloga, Phosphonatantibiotika wie Fosfomycin und Phosphinothricin und als 2-Aminoethylphosphonsäure, die vor allem in pflanzlichen und tierischen Membranen zu finden ist, vor. In den letzten Jahrzehnten wurde eine wachsende Anzahl synthetischer Phosphonate entwickelt. Diese sind industriell bedeutsam als Weichmacher, Chelatbildner, Flamm- schutzmittel und Klebstoffe (Hilderbrand, 1983). Eine wichtige Rolle nehmen Phosphonate auch in der modernen Landwirtschaft ein. Sie werden als Phosphonatinsektizide oder in Form von Totalherbiziden eingesetzt.

2.3.1 Glyphosat

Das am häufigsten eingesetzte Phosphonatxenobiotikum ist Glyphosat (Kertesz, 1994). Glyphosat als aktiver Wirkstoff in Roundup[®] wurde im Jahre 1971 von der Firma Monsanto auf den Markt gebracht. Es handelt sich hierbei um ein nicht-selektives Blattherbizid mit systemischer Wirkung, das zur Unkrautbekämpfung einjähriger und mehrjähriger Unkräuter eingesetzt wird (Roundup, 2002; Hassall, 1990, S. 390).

Die Wirkung von Glyphosat auf Pflanzen beruht darauf, dass die Reaktion der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthase (EPSPS) inhibiert wird (McDowell *et al.*, 1996). EPSPS ist ein Schlüsselenzym des Shikimatweges, das ausschließlich in Pflanzen und Mikroorganismen vorkommt (Skarynsky *et al.*, 1996). Dieses Enzym ist eine Enolpyruvyl-transferase, welche die Kondensation von Shikimat-3-phosphat und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSP) katalysiert. EPSP folgt dem Chorismatweg, dessen Endprodukte die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind. Glyphosat agiert als kompetitiver Inhibitor von PEP und bildet mit Shikimat-3-phosphat und EPSPS einen stabilen Ternärkomplex (McDowell *et al.*, 1996), der bewirkt, dass in den behandelten Pflanzen die Biosynthese der essentiellen aromatischen Aminosäuren unterbunden wird und diese ausgedünnt werden. Glyphosat wird ausschließlich über die grünen Pflanzenteile aufgenommen und durch das Phloem in der gesamten Pflanze verteilt. Die behandelte Pflanze, einschließlich der unterirdischen Dauerorgane, stirbt innerhalb von sieben bis vierzehn Tagen vollständig ab (Roundup, 2002). Glyphosat wurde

von der WHO ein Toxizitätslevel von IV (Gefährlichkeit unbedenklich, bei sicherer Anwendung) zuerkannt (Hurtig *et al.*, 2003). Wird Glyphosat in einer 100-fach höheren Konzentration als in der Landwirtschaft üblich eingesetzt, ist es in bodenextraktfreiem Medium für zahlreiche Bakterien und Pilze toxisch. Wird dieselbe Konzentration hingegen auf den Boden aufgebracht, ist sie für Bakterien und Pilze nicht toxisch (Busse *et al.*, 2001).

2.3.1.1 Applikation von Glyphosat

Glyphosat (N-Phosphonomethylglycin, Abb. 3) wird primär in der Landwirtschaft eingesetzt, sowie in der Forstwirtschaft und zur Unkrautbekämpfung an Bahndämmen. In Abhängigkeit vom Unkraut- und Artenspektrum beträgt die Aufwandmenge 3 – 5 l Roundup[®]/ha, bei einem Wirkstoffgehalt von 360 g Glyphosat/l (Roundup, 2002). Die Applikation von Glyphosat erfolgt als Nachauflaufbehandlung und als Vorernteapplikation, beispielsweise in stehender Wintergerste, um Zwiewuchs und Unkräuter im Bestand abzutöten (Roundup, 2002).

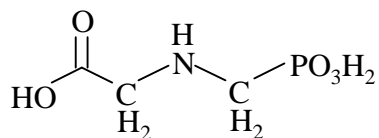


Abb. 3: Strukturformel von Glyphosat (N-Phosphonomethylglycin)

2.3.1.2 Glyphosatresistente Pflanzen

Das Breitbandherbizid Glyphosat wird auch als Herbizidresistenzsystem angewendet, in dem eine glyphosatresistente Kulturpflanze in Kombination mit dem Komplementärherbizid Glyphosat verwendet wird. Im Jahr 2002 wurden weltweit in sieben verschiedenen Ländern auf 36,5 Millionen Hektar herbizidresistenter Soja angebaut. Bei mehr als der Hälfte handelte es sich dabei um glyphosatresistenten Soja (ISAAA, 2003). Seit einigen Jahren sind in den USA gentechnisch veränderte Pflanzen auf dem Markt. Vor allem transgene Sojapflanzen, die gegen Glyphosat resistent sind, nehmen eine bedeutende Rolle ein. Eine Möglichkeit glyphosatresistente Pflanzen zu erhalten, besteht darin, das EPSPS-Gen von *Agrobacterium* sp. CP4 (CP4-EPSPS-Gen) in Pflanzen zu inserieren. Dieses Gen kodiert für eine alternative EPSPS, die weniger sensitiv gegenüber Glyphosat ist als die endogene EPSPS (Tan *et al.*, 2006). Durch Strukturunterschiede zur pflanzlichen EPSPS wird die EPSPS von *Agrobacterium* sp. CP4 nicht durch Glyphosat gehemmt und aromatische Aminosäuren können synthetisiert werden. Die meisten Pflanzen besitzen keine oder nur eine geringe

endogene Fähigkeit Glyphosat abzubauen (Stock *et al.*, 1991). Deshalb wird zur Detoxifizierung von Glyphosat häufig auch das *gox*-Gen von *Ochrobactrum anthropi* in die gentechnisch veränderte Kulturpflanze eingebracht. Dieses Gen befähigt die Pflanze zum Abbau von Glyphosat zu Glyoxylat und AMPA. Dadurch wird die Menge an Glyphosat, die das Targetenzym EPSPS erreicht, reduziert (OECD, 1999). Im Jahre 2001 wurden allein in den USA 20,4 Millionen Hektar glyphosatresistenter Soja angebaut (Transgen, 2003). Glyphosatresistente Kulturpflanzen wurden für Soja (*Glyzine max*, Delannay *et al.*, 1995), Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L., Madsen *et al.*, 1993), Baumwolle (*Gossypium hirsutum* L., Keeling *et al.*, 1996), Mais (*Zea mays* L., Johnson *et al.*, 1998) und Raps (*Brassica napus*, Coleman und Jenks, 1999) entwickelt und kommerzialisiert.

2.3.1.3 Abbau von Phosphonaten

Lebende Organismen decken ihren Bedarf an Phosphor primär über anorganischen Phosphor. Phosphor befindet sich dabei in seiner höchsten Oxidationsstufe von + 5 (Metcalf und Wanner, 1991). Phosphonatxenobiotika werden von Mikroorganismen in den meisten Fällen unter Phosphatmangelbedingungen als einzige Phosphatquelle zum Wachstum verwendet (Ternan *et al.*, 1998). Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Fähigkeit, C-P-Verbindungen zu spalten, ubiquitär in Bakterien vorhanden (Dick und Quinn, 1995) ist. Die C-P-Verbindung wird durch mindestens vier bakterielle Enzyme gespalten. Ein Enzym ist die Phosphonatase, welche die Spaltung der C-P-Bindung von 2-Phosphonoacetaldehyd zu Acetaldehyd und anorganischem Phosphat katalysiert. Ein weiteres Enzym ist die Phosphonoacetathydrolase, die Phosphonoacetat zu Essigsäure und anorganischem Phosphat spaltet. Der Abbau von unsubstituierten Phosphonaten und von Alkyl- und Arylorganophosphonaten erfolgt durch das dritte Enzym, die C-P-Lyase. Diese katalysiert die Spaltung von Organophosphonaten zu den entsprechenden Kohlenstoffwasserstoffverbindungen und anorganischem Phosphat. Das vierte Enzym schließlich, die Phosphonopyruvathydrolase, katalysiert die Spaltung von 3-Phosphonopyruvat zu Pyruvat und anorganischem Phosphat (Kononova und Nesmeyanova, 2002). Während die Phosphonoacetathydrolase und die Phosphonopyruvathydrolase bisher nur in *Pseudomonas* (Kulakova *et al.*, 1997) und *Burkholderia* (Ternan *et al.*, 2000) nachgewiesen wurden, sind der C-P-Lyasekomplex und die Phosphonatase, die beide unter Phosphatmangelbedingungen exprimiert werden, für den Abbau der meisten Phosphonate in der Natur verantwortlich (Kononova und Nesmeyanova, 2002).

Der erste indirekte Beweis der Spaltung einer C-P-Verbindung durch Bakterien wurde durch

Zeleznick *et al.* (1963) erbracht. *E. coli* konnte hierbei sein Wachstum auf den synthetischen Organophosphonaten Methyl- und Ethylphosphonat als einzigen Phosphatquellen aufrechterhalten. La Nauze *et al.* (1970) konnten schließlich einen direkten Beweis für die enzymatische Spaltung einer C-P-Verbindung liefern, indem sie eine Phosphonatase von *Bacillus cereus* aufreinigten und charakterisierten.

2.4 Das C-P-Lyase-Operon

Die C-P-Lyase besitzt im Vergleich zur Phosphonatase eine breite Substratspezifität und kann sowohl substituierte als auch unsubstituierte Phosphonate spalten (Wanner, 1994). Die Gene, die für die C-P-Lyase kodieren, befinden sich in *E. coli* in einem ca. 10,9 kb großen Operon (Abb. 4). Dieses Operon, das die Gene *phnC* bis *phnP* umfasst, wird durch Phosphatmangelbedingungen induziert. Der Promotor befindet sich oberhalb von *phnC* (Metcalf und Wanner, 1993). Die Gene *phnC*, *phnD* und *phnE* kodieren für einen Bindeprotein-abhängigen Phosphonattransport. Die Genprodukte von *phnF* und *phnO* spielen eine Rolle in der Genregulation, während die Genprodukte von *phnG*, *phnH*, *phnI*, *phnJ*, *phnK*, *phnL*, *phnM*, *phnN* und *phnP* den C-P-Lyase Enzymkomplex bilden (Wanner und Metcalf, 1992). Das Genprodukt PhnJ hat in *Sinorhizobium meliloti* vier konservative Cysteinreste, die Liganden für Metalle sein können oder Bindestellen für schwefelhaltige Metallkomplexe. Dies lässt darauf schließen, dass Metalle in die Katalyse des Alkylphosphonatabbaus involviert sind (Kononova und Nesmeyanova, 2002). Bisher ist es nicht gelungen, eine C-P-Lyaseaktivität in einem zellfreien Extrakt nachzuweisen. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass die C-P-Lyase membranassoziiert ist (Wackett *et al.*, 1987).

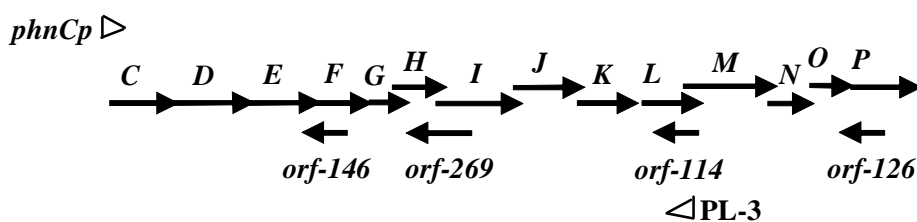


Abb. 4: *phn*-Operon in *E. coli*; nach rechts gerichtete Pfeile: 14 Gene, die für Phosphonatabbau benötigt werden; *phnCp*: durch anorganisches Phosphat regulierter Promotor dieser Gene; vier ORFs und ein Promotor (PL-3) auf dem gegenüberliegenden Strang (Metcalf und Wanner, 1993)

Die Gene des C-P-Lyaseweges kommen meist in einem Cluster vor, werden aber nicht immer in derselben Richtung transkribiert. Das Gen *phnF* wird - außer in γ -Proteobakterien - meist in der entgegengesetzten Richtung transkribiert. Während bei den meisten α -Proteobakterien und Bakterien, die nicht zu den Proteobakterien gehören, die Gene *phnG* bis *phnM*

aufeinander folgend angeordnet sind, werden bei γ -Proteobakterien die *phn*-Gene durch Gene, die für hypothetische oder andere Proteine kodieren, unterbrochen (Huang, 2005).

Viele *phn*-Genkluster sind benachbart zu mobilen genetischen Elementen wie Transposasen oder inaktivierten Transposasen. Dies deutet auf die Bedeutung eines lateralen Gentransfers für das *phn*-Operon im Laufe der Evolution hin (Huang, 2005). Mobile Elemente übertragen Gene nicht direkt von einer Zelle zur anderen, besitzen aber die Fähigkeit, Gene auf Plasmide zu übertragen. In einigen Bakterien (*Nostoc*, *Trichodesmium*, *Chloroflexus* und *Oceanobacillus*) gibt es Hinweise auf einen horizontalen Gentransfer des *phn*-Operons (Huang, 2005).

2.5 Abbau von Glyphosat im Boden

Glyphosat, das auf den Boden gelangt, wird durch das Zusammenspiel verschiedener Mikroorganismen fast vollständig zu Wasser, Kohlendioxid und Phosphat abgebaut. Die Abbauraten von Glyphosat im Boden wurden in den meisten Studien durch die Aufbringung von ^{14}C -markiertem Glyphosat und die Messung des freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$ ermittelt (Torstensson, 1985; Reimer *et al.*, 2005; von Wirén-Lehr *et al.*, 1997). Die Halbwertszeiten variieren dabei erheblich zwischen weniger als einer Woche und mehreren Monaten bis Jahren (Torstensson, 1985). Die Abbaurate von Glyphosat im Boden kann nicht auf einen einzigen Bodenfaktor zurückgeführt werden, sondern sie korreliert mit der generellen mikrobiellen Aktivität des Bodens, die von verschiedenen Bodenfaktoren beeinflusst wird (Torstensson, 1985). Darüber hinaus wird die Mineralisierung von Glyphosat durch die schnelle Adsorption von Glyphosat an Bodenpartikel limitiert (Moshier und Penner, 1978). Glyphosat bindet dabei mit der Phosphonsäuregruppe an Bodenpartikel (Sprankle *et al.*, 1975). Glyphosat und Phosphat konkurrieren wahrscheinlich um dieselben Adsorptionsstellen, wobei die Affinität für Phosphat am größten ist (Gimsing und Borggaard, 2002). Die Adsorption von Glyphosat ist positiv mit dem Eisen- und Aluminiumgehalt und dem Gehalt an Tonmineralien im Boden korreliert, während die organische Substanz im Boden um die Adsorptionsstellen konkurriert und dadurch die Adsorption inhibiert (Gerritse *et al.*, 1996). Der Grad der Adsorption wird durch einen niedrigen pH-Wert begünstigt (Miles und Moye, 1988). Trotz der starken Adsorption im Boden ist eine Desorption von Glyphosat möglich (Torstensson, 1985).

Der Glyphosatabbau erfolgt über zwei verschiedene Wege (Abb. 5). Im ersten Abbauweg

erfolgt die Spaltung der C-P-Bindung bereits im ersten Schritt durch eine C-P-Lyase, wobei das Aminosäureanalogon Sarkosin und anorganisches Phosphat entsteht. Im weiteren Verlauf wird Sarkosin zu Glyzin und einer C1-Verbindung umgewandelt, die in Purine und einige Aminosäuren eingebaut wird (Ternan *et al.*, 1998; Klimek *et al.*, 2001). Der Abbau von Glyphosat über das Intermediat Sarkosin wurde für *Pseudomonas* sp. (Moore *et al.*, 1983; Kishore und Jacob, 1987; Dick und Quinn, 1995), *Arthrobacter* sp. (Pipke und Amrhein, 1988), *Sinorhizobium meliloti* (Liu *et al.*, 1991) und *Streptomyces* sp. (Obojska *et al.*, 1999) beschrieben.

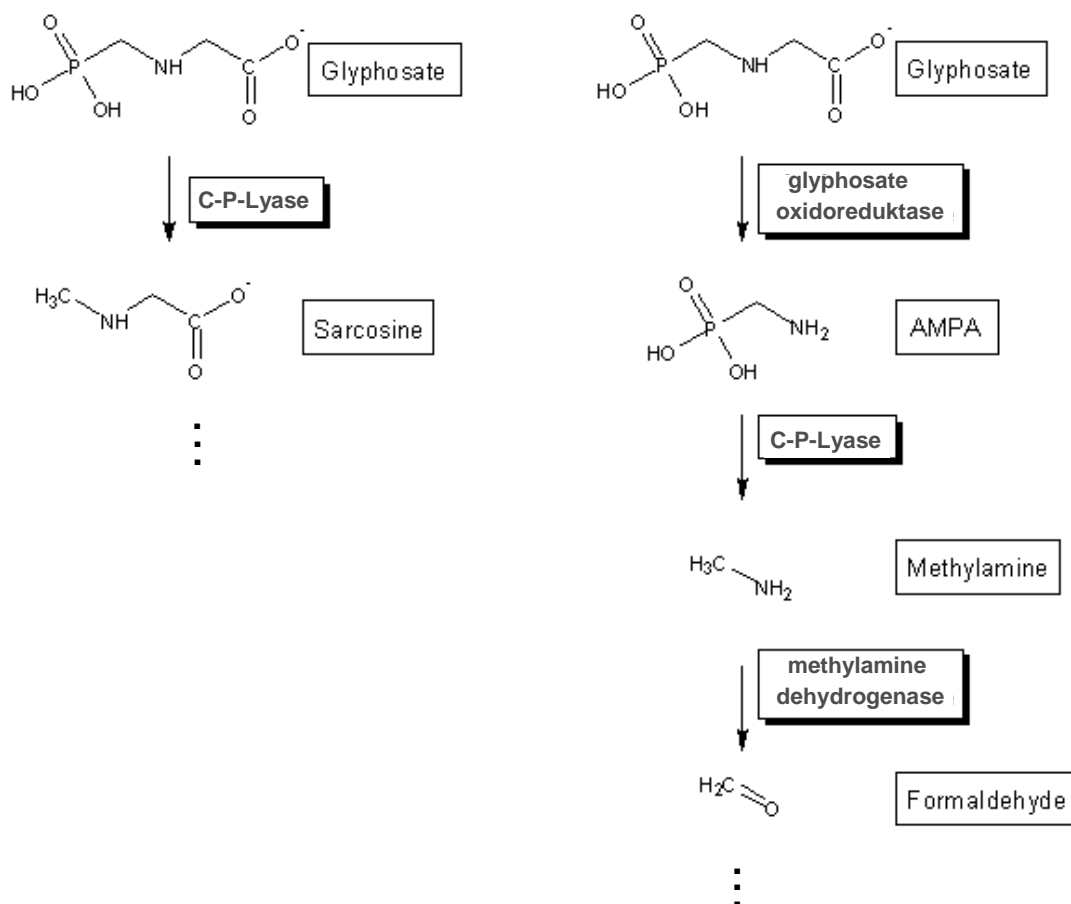


Abb. 5: Abbauwege von Glyphosat im Boden (http://umbbd.ahc.umn.edu/gly/gly_image_image_map.html, modifiziert)

Beim zweiten Abbaupfad wird im ersten Schritt die C-N-Bindung durch die Glyphosat-oxidoreduktase gespalten, wobei AMPA und Glyoxylat entsteht. Erst im zweiten Schritt folgt die Spaltung der C-P-Bindung durch die C-P-Lyase. Dabei wird Methylamin und Orthophosphat freigesetzt (Ternan *et al.*, 1998; Klimek *et al.*, 2001). AMPA wurde als das Hauptabbauprodukt im Boden identifiziert (Sprankle *et al.*, 1975, Rueppel *et al.*, 1977). Die Degradation von Glyphosat über das Intermediat AMPA wurde für *Flavobacterium* sp.

(Balthazor und Hallas, 1986), *Arthrobacter atrocyaneus* (Pipke und Amrhein, 1988), *Agrobacterium radiobacter* (Mc Auliffe *et al.*, 1990), *Alcaligenes* sp. (Lerbs *et al.*, 1990), *Xanthomonas maltophilia* (Carson *et al.*, 1997) und *Geobacillus caldoxylosilyticus* (Obojska *et al.*, 2002) beschrieben.

Glyphosat wird in den meisten Fällen ausschließlich unter Phosphatmangelbedingungen als einzige Phosphatquelle genutzt. Eine Ausnahme hierzu bilden *Streptomyces* sp. (Obojska *et al.*, 1999) und *Agrobacterium radiobacter* (Wackett *et al.*, 1987), die Glyphosat auch dann abbauen, wenn Phosphat im Medium vorhanden ist. Die Nutzung von Glyphosat als einzige Phosphatquelle durch Pilze wurde bisher für *Penicillium notatum* (Bujacz *et al.*, 1995), *Trichoderma harzianum*, *Scopulariopsis* sp. und *Aspergillus niger* (Krzysko-Lupika *et al.*, 1997) beschrieben. Bisher konnten keine Mikroorganismen isoliert werden, die Glyphosat als einzige C-Quelle nutzen konnten. Hingegen konnten *Penicillium chrysogenum* (Klimek *et al.*, 2001) und *Streptomyces* sp. (Obojska *et al.*, 1999) Glyphosat als einzige N-Quelle nutzen.

Die meisten Untersuchungen auf landwirtschaftlichen Flächen ergaben entweder keine Beeinflussung oder eine leichte Stimulierung der Bodenmikroorganismen durch Glyphosat (Busse *et al.*, 2001). Die Anzahl kultivierbarer Bakterien und Pilze stieg durch die Applikation von Glyphosat an (Roslycky, 1982; Rueppel *et al.*, 1977). Die Fähigkeit zum Abbau von Glyphosat war bereits vor der Einführung des Herbizids im Jahre 1971 in der Natur vorhanden. Beispielsweise war ein Stamm von *Arthrobacter atrocyaneus*, der sich seit 1956 in einer Typstammsammlung befand, fähig Glyphosat abzubauen (Pipke und Amrhein, 1988). Mikrobielle Gemeinschaften können sich an den Abbau von Glyphosat adaptieren. Wird das Herbizid wiederholt aufgebracht, erfolgt der Abbau schneller als bei der ersten Applikation (Quinn *et al.*, 1988).

2.6 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit war Teil eines Verbundprojektes, das gemeinschaftlich von verschiedenen Arbeitsgruppen des Instituts für Bodenökologie und des Instituts für Biochemische Pflanzenpathologie an dem GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg bearbeitet wurde. Ziel dieses Projektes, das im Jahre 2002 begann, war es, unter anderem den Abbau von Glyphosat bei wiederholter Applikation zu verfolgen und die Folgen für die Qualität von Böden und angrenzende Habitats (z. B. Grundwasser) zu erfassen.

Basierend auf den verfügbaren Daten in der Literatur wurde postuliert, dass auch nach wiederholter Applikation Glyphosat vollständig mineralisiert wird. Entsprechend sollten glyphosatabbauende Bakterien und die Gene, die für den Abbau kodieren, aus dem Boden isoliert werden können. Um diese Hypothesen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Böden auf dieses mikrobielle Potenzial untersucht und die folgenden Ziele verfolgt.

- I. Den Einfluss der Glyphosatapplikation auf Bodenmikroorganismen zu erfassen.
- II. Bakterien aus dem Boden zu isolieren, die Glyphosat als einzige P-Quelle nutzen können.
- III. Eine Metagenombank aus der Boden-DNS zu konstruieren und nach Genen zu suchen, die für den Glyphosatabbau relevant sind.
- IV. C-P-Lyase kodierende Gene nachzuweisen und die Beeinflussung ihrer Diversität durch Glyphosat darzustellen.

3. Material und Methoden

3.1 Bodenmaterial und experimentelles Design des Modellversuchs

Bodenproben zur Isolierung glyphosatabbauender Bakterien, zur Gewinnung von Nukleinsäuren und zur Herstellung von Bodenextraktmedium wurden von dem Schlag A17 des Klostergutes in Scheyern (N 48°30,0'; O 11°20,7') und von einer landwirtschaftlich genutzten Fläche in Neumarkt in der Oberpfalz (N 49°28,0'; O 11°46,3') vom Ap-Horizont entnommen. Bei dem Boden aus Scheyern (A17) handelte es sich um einen Luvisol, der integriert bewirtschaftet wurde, bei dem Boden aus Neumarkt (NM) um einen Cambisol, der konventionell bewirtschaftet wurde. Tabelle 1 gibt einige Kenndaten der Böden der untersuchten Standorte wieder. Hauptunterschiede sind in der Körnung (schluffig bzw. sandig) und im Gehalt an organischer Substanz gegeben.

Tab. 1: Kenndaten der Oberböden (Ap) der untersuchten Agrarstandorte Scheyern (Flessa *et al.*, 2002) und Neumarkt (Dörfler *et al.*, 1994)

	Tiefe	Sand (%)	Schluff (%)	Ton (%)	pH (CaCl ₂)	Corg (g/kg)	Nt (g/kg)
Scheyern (A17)	0-25	22,0	59,0	19,0	5,9	14,3	1,3
Neumarkt (NM)	0-28	85,0	10,0	5,0	4,9	10,3	1,0

Bodenproben vom schluffigen Boden A17 wurden am 29.07.2002 entnommen. An diesem Standort wurde zu diesem Zeitpunkt Winterweizen (*Triticum aestivum*) angebaut. Die Fruchtfolge an diesem Standort setzte sich aus Winterweizen, Silomais, Winterweizen und Kartoffel zusammen. In den Monaten März, April und Juni 2002 wurde der Boden mit Stickstoffdünger (138-167 l/ha; N-Input: 50-70 kg/ha) versetzt. Touchdown® (Glyphosat) wurde im April 2001 (3 l/ha) aufgebracht. Bodenproben vom sandigen Boden NM wurden am 19.07.2002 genommen. Zu diesem Zeitpunkt wuchs Roggen (*Secale cereale*) an diesem Standort. Die Fruchtfolge war Roggen, Mais, Gerste, Roggen. Auf den Boden wurde im Mai NPK-Dünger (400 kg/ha) aufgebracht. Glyphosat wurde auf diesen Boden noch nie beaufschlagt.

Die frischen Bodenproben wurden vor der Verwendung auf eine Korngröße von 2 mm gesiebt. Der Wassergehalt der Böden wurde auf 40 % der maximalen Wasserhaltekapazität

eingestellt. Je 3,2 kg Boden vom Schlag A17 beziehungsweise 3,7 kg Boden aus Neumarkt wurden in gleichmäßiger Dichte (A17: $1,49 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$; NM: $1,72 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) in zylindrische Mikrokosmen gefüllt. Die Inkubationsbehältnisse mit einer Höhe von 20 cm wurden mit einer Deckel- und einer Bodenplatte abgeschlossen. Den Abschluss zur Bodenplatte bildete eine Lage feinporiger Gaze und zwei Lagen Membranfilter (Sartolon Polyamid, SM250G, Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit einer Porengröße von $0,45 \mu\text{m}$. Die Bodenplatte besaß eine Steckverbindung zur Gewinnung von Perkolat. Die Deckelplatte war zentral mit einer Regendüse sowie mit zwei Steckverbindungen für Zu- und Abluft versehen. Die Inkubationsbehältnisse (Abb. 6), wurden luftdicht verschlossen und an eine automatisierte Belüftungsanlage (Hantschel *et al.*, 1994) angeschlossen. Die Mikrokosmen wurden abgedunkelt und bei Raumtemperatur (ca. $20 \text{ }^\circ\text{C}$) inkubiert. Das Perkolat wurde durch einen kontinuierlich angelegten Unterdruck von $0,1 \text{ hPa}$ in Sammelflaschen aufgefangen. Die Belüftung des Gasraumes der Mikrokosmen erfolgte durch handelsübliche Druckluft mit atmosphärischen Konzentrationen an Spurengasen (ca. 350 ppm CO_2 , ca. $320 \text{ ppb N}_2\text{O}$, ca. 1740 ppb CH_4), wobei der Gasfluss auf 25 ml/Min. eingestellt wurde. Die Messung und Aufzeichnung erfolgte kontinuierlich über ein rechnergesteuertes Flowmeter. In der Abluft der Mikrokosmen wurde kontinuierlich die Konzentration der Spurengase Kohlendioxid, Distickstoffoxid und Methan gaschromatographisch (acht Analysen h^{-1}) gemessen. Der Gaschromatograph (GC-14B, Shimadzu, Duisburg, Deutschland; Trennsäule: Porapack Q, $150\text{-}200 \mu\text{m}$, Millipore, Schwalbach, Deutschland; Ofentemperatur: $60 \text{ }^\circ\text{C}$; Detektortemperatur: $280 \text{ }^\circ\text{C}$) detektierte Methan über einen Flammenionisationsdetektor (FID) und Kohlendioxid und Distickstoffoxid über einen Elektronen-Einfang-Detektor (ECD) mit Stickstoff (ECD-Qualität) als Trägergas. FID (für CH_4) und ^{63}Ni -ECD (für CO_2 und N_2O) waren in dem Gaschromatographen in Serie geschaltet.

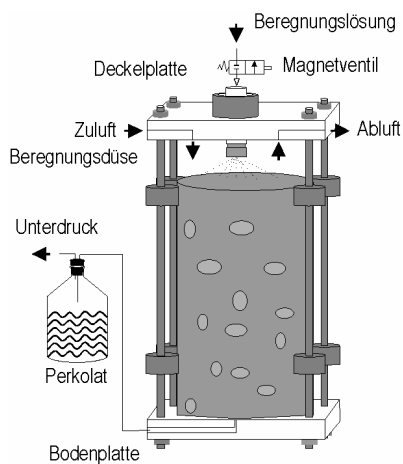


Abb. 6: Schematische Darstellung der verwendeten Mikrokosmen (Kamp *et al.*, 1998)

Zum Ausgleich von Verdunstungsverlusten wurden die Mikrokosmen während der Vorlaufphase einmal, einen Tag vor der Glyphosatapplikation, eine Woche nach Glyphosatapplikation und unmittelbar vor der Probenahme mit Leitungswasser beregnet. Die Beregnung erfolgte in festgesetzten Abständen von acht Tagen. Nach einer Vorlaufphase von acht Wochen wurden je drei Mikrokosmen pro Boden mit in Leitungswasser gelöstem Glyphosat (N-Phosphonomethylglycin, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland) beregnet. Dabei wurde die doppelte, der von Monsanto empfohlenen, Aufwandmenge eingesetzt. Die Aufwandmenge betrug 3 – 5 l Roundup Ultra[®] pro Hektar bei einer Glyphosatmenge von 360 g/l Roundup Ultra[®]. Pro Mikrokosmos wurden 4,75 mg Glyphosat eingesetzt. Je drei Mikrokosmen pro Boden dienten als Kontrolle und wurden nur mit Leitungswasser beregnet. Zwei Wochen nach Glyphosatapplikation wurden pro Boden zwei Mikrokosmen ausgewählt (ein Mikrokosmos mit Glyphosatapplikation und ein Kontrollmikrokosmos) und Bodenproben aus einer Tiefe von 0 – 5 cm entnommen. Die Bodenproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C (Tenak Ultra Low Freeze, MM Europe, Herlev, Dänemark) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt, beziehungsweise zur Isolierung von Bakterien bei Raumtemperatur weiterverarbeitet.

Die Berechnung der Produktions- bzw. Aufnahmeraten von CH₄, CO₂ und N₂O in den Mikrokosmen erfolgte gegen die Nullluft unter Einbeziehung der Gasdurchflussmenge und wurden nach folgender Formel berechnet:

$$P = (c_{MK} - c_{L0}) \cdot \Phi$$

P: Produktion (µl/Min.); c_{MK}: Gaskonzentration der Mikrokosmen (µl/l); c_{L0}: Gaskonzentration der Null-Luft (µl/l); Φ: Gasdurchflussmenge (l/h)

Die online-Messung wurde mit dem Programm MK4ERG 1.4 (Messwert GmbH, Göttingen, Deutschland) ausgewertet.

Der Gasfluss F wurde nach der folgenden Formel berechnet: $F = k T_0 T_1^{-1} A^{-1} c \Phi$.

k Multiplikator aus Molgewicht M und Molvolumen V:

$$k = M \cdot V^{-1}$$

$$M_C = 12 \text{ g mol}^{-1}$$

$$M_N = 14 \text{ g mol}^{-1}$$

$$V = 22,4 \text{ l mol}^{-1}$$

→ $k_{\text{CO}_2} = 0,536 \text{ } \mu\text{g C } \mu\text{l}^{-1}$
 $k_{\text{N}_2\text{O}} = 1,25 \text{ } \mu\text{g N } \mu\text{l}^{-1}$
 $k_{\text{CH}_4} = 0,536 \text{ } \mu\text{g C } \mu\text{l}^{-1}$

T_0 Normaltemperatur (273,15 K)
 T_1 Inkubationstemperatur (293,15 K)
A Grundfläche der Mikrokosmen (m^2); $A = \pi \cdot r^2$; $d = 0,143 \text{ m}$; $A = 0,0161 \text{ m}^2$
c Gaskonzentration ($\mu\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$)
 Φ Gasfluss bezogen auf 1 h; $1,5 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$

Die Gasflüsse wurden für CO_2 in $\text{mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ und für N_2O und CH_4 in $\mu\text{g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ angegeben.

Die Bestimmung des Wassergehaltes, der Trockensubstanz und der maximalen Wasserhaltekapazität erfolgte nach Schinner *et al.* (1991).

3.2 Mikroorganismenstämme und Plasmide

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide und ihre Herkunft sind in den folgenden Tabellen 2, 3 und 4 dargestellt.

Tab. 2: Verwendete Mikroorganismen

Organismus	Referenz
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	DSM 20127
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	DSM 2839
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	DSM 14371
<i>Silicibacter pomeroyi</i>	DSM 15171

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

Tab. 3: Verwendeter *Escherichia coli* Stamm

Organismus	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> TransforMax™ EC100™	$F^- mcr A \Delta(mrr-hsd RMS-mcr BC) \Phi 80dlac Z\Delta M15 \Delta lac X74 rec A1 end A1 ara D139 \Delta(ara, leu)7697 gal U gal K \lambda^- rps L nup G$	Biozym, Hessisch Oldendorf

Tab. 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz/Herkunft
pBeloBAC11	<i>par A par B par C lac Z Cm^R ori S rep E</i>	Kim <i>et al.</i> , 1996/Lehner, TU-München
pUC19	<i>bla lac IOPZ</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985/Biozym, Hessisch Oldendorf
pCR [®] 2.1	<i>lac Za Km^R Amp^R pUC ori</i>	Invitrogen, Karlsruhe

3.3 Kultivierungsabhängige mikrobiologische Methoden

3.3.1 Nährmedien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Bakterien mit den von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen empfohlenen Nährmedien unter den genannten Bedingungen kultiviert. Die Nährmedien wurden in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (Varioklav 250T, H + P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland) für 20 Minuten bei 121 °C und $1,013 \cdot 10^5$ Pa Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Substanzen wie Hemmstoffe und chromogene Substrate wurden sterilfiltriert (Minisart, 0,2 µm Celluloseazetat, Sartorius, Göttingen, Deutschland) und nach Absinken der Temperatur des Mediums auf ca. 45 °C steril zugesetzt. Feste Medien wurden vor dem Autoklavieren mit 1,8 % Agar (Typ RG, Bernd Euler, Frankfurt am Main, Deutschland) versetzt.

Zur Isolierung potenzieller glyphosatabbauender Bakterien wurde in Anlehnung an Liu *et al.* (1991) phosphatfreies MOPS-Medium hergestellt. Das Medium enthielt 25 mM MOPS/KOH (pH 7,4), 2 mM MgSO₄, 0,1 mM Eisenzitat, 1,2 CaCl₂, 33 mM NH₄Cl, 0,5 mg Thiamin · HCl pro Liter, 1 mg Nikotinsäure pro Liter, 0,1 mg Biotin pro Liter, 0,5 mg Pantothenensäure pro Liter und Spurenelemente (0,8 µM CoCl₂, 40 µM CuSO₄, 14 µM H₃BO₃, 0,1 µM MnCl₂, 10 µM Na₂MoO₄, 0,2 µM NiSO₄, 1,5 µM ZnSO₄) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Als einzige C-Quelle enthielt das Medium 0,2 % (wt/vol) Glucose (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und als alleinige P-Quelle 0,5 mM beziehungsweise 1,5 mM Glyphosat. Die Stammlösung von Glyphosat betrug 6,25 mg/ml in H₂O_{dd}, wobei zum Sterilfiltrieren Nylon-spritzenfilter (0,2 µm Porengröße, neoLab, Heidelberg, Deutschland) verwendet wurden. Alle Gefäße, die mit dem Medium in Berührung kamen, wurden, um sie phosphatfrei zu machen, vor Gebrauch mit 1 M HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) und anschließend mit H₂O_{dd} gespült. Als Kontrollmedien wurde zum einen phosphatfreies MOPS-Medium ohne den

Zusatz von Glyphosat und zum anderen MOPS-Medium mit dem Zusatz von 0,5 mM beziehungsweise 1,5 mM K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwendet.

Luria-Bertani-Nährmedien wurden nach den Empfehlungen von Sambrook und Russell (2001) hergestellt.

3.3.2 Hemm- und Zusatzstoffe

Alle *E. coli* Stämme, die ein rekombinantes Plasmid enthielten, wurden zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks auf Luria-Bertani-Medium (Miller, 1992) angezogen, welches in Abhängigkeit der verwendeten Plasmide Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer Endkonzentration von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ bzw. Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ enthielt. Chloramphenicol wurde in einer Stammlösung von 20 mg/ml in 100 % Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) hergestellt und bei 6 °C aufbewahrt. Die Stammlösung von Kanamycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) betrug 20 mg/ml in H_2O_{dd} und wurde bei 6 °C aufbewahrt. Das chromogene β -Galaktosidase-Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) wurde dem Nährboden in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt, um rekombinante Transformanten anhand ihrer Koloniefärbung identifizieren zu können (Messing *et al.*, 1977). Die Stammlösung von X-Gal betrug 20 mg/ml Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und wurde bei -20 °C aufbewahrt. IPTG (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verstärkte die Enzymreaktion als Induktor der β -Galaktosidase. Es wurde als 20 prozentige Lösung in H_2O_{dd} hergestellt, aliquotiert und in einer Endkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. INT (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) konnte als künstlicher Elektronenakzeptor in Farbossays Dehydrogenaseaktivitäten anzeigen (Nachlas *et al.*, 1960). Es wurde als 4 mg/ml Stammlösung in H_2O_{dd} angefertigt, bei 6 °C gelagert und in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ verwendet.

MOPS-Medium zur Isolierung von glyphosatabbauenden Bakterien wurde zur Inhibierung des Pilzwachstums Cycloheximid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Cycloheximid wurde in einer Stammlösung von 10 mg/ml Ethanol hergestellt und bei 6 °C aufbewahrt.

3.3.3 Bakterienkultivierung

Die Anzucht aerob wachsender Bakterienstämme erfolgte als Flüssigkultur in 10 ml Reagenzgläsern, in Erlenmeyerkolben oder auf agarhaltigen festen Nährböden in Petrischalen. Die Inkubationstemperaturen betragen für potenziell glyphosatabbauende Bakterien Raumtemperatur, für *E.coli* 37 °C und für alle übrigen Bakterienstämme die von der DSMZ empfohlene Temperatur.

3.3.4 Gewinnung potenzieller Glyphosat abbauender Isolate

Zur Isolierung von Bakterien, die in der Lage sind Glyphosat abzubauen, wurde pro Standort von den Mikrokosmen, denen Glyphosat verabreicht wurde, 1 g Boden mit 9,0 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt und 10 Min. in der Schwingmühle bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt (Modell MM2, Retsch, Haan, Deutschland). Anschließend wurde die Bodensuspension 60 Min. bei Raumtemperatur präzipitiert. 4 ml Überstand von A17 und 6 ml Überstand von NM wurden entnommen, abzentrifugiert (5 Min., 14000 g) und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 2 ml 0,9 % NaCl resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift zur Entfernung von Phosphatresten wurde vier weitere Male wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 1 ml 0,9 % NaCl aufgenommen, 10^{-1} verdünnt, auf agarhaltigem MOPS-Medium (0,5 mM Glyphosat, siehe 3.3.1) ausplattiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Boden wurden 50 nach ihrer Morphologie möglichst unterschiedliche Bakterien ausgewählt.

3.3.5 Stammhaltung

Die verwendeten Bakterienstämme wurden auf Agarplatten maximal vier Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Die Reinheitsüberprüfung erfolgte mittels Reinigungsausstrichen. Für längerfristige Lagerungen wurden zusätzlich Glycerinkulturen (Glyzerin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und bewachsenes Nährmedium) angelegt. Die Konzentration von Glyzerin betrug dabei 50 %. Die Glycerinkulturen wurden bei - 80 °C aufbewahrt. Zusätzlich wurden auch gefriergetrocknete Zellsuspensionen angelegt.

3.3.6 Physiologische Identifizierung der Isolate

Die Isolate wurden einem Schnelltest mit Bactident[®] Aminopeptidase (Merck, Darmstadt,

Deutschland) unterzogen. Dieser Test ermöglichte durch Farbumschlag den Nachweis von in der bakteriellen Zellhülle lokalisierter L-Alanin-Amino-peptidase. Dieses Enzym kommt in relevanter Aktivität fast nur bei gramnegativen Bakterien vor, Amino-peptidase-Reaktion und Gram-Verhalten konnten somit korreliert werden. Von 2 ml Flüssigkultur ausgehend wurde genomische DNS nach Herstellerangaben extrahiert, wobei die Inkubationszeit der enzymatischen Lyse für die Isolierung grampositiver Bakterien auf 60 Min. erhöht wurde.

3.3.7 Nukleinsäureisolierung aus Bakterien

Genomische DNS von Bakterien wurde durch Verwendung des DNeasy[®] Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen. Hierbei wurde die DNS nach der Lyse der Zellen selektiv an eine Silikagelmembran gebunden. Kontaminationen und Enzyminhibitoren wurden durch Waschschriffe entfernt und die DNS wurde anschließend von der Matrix eluiert.

3.4 Kultivierungsunabhängige mikrobiologische Methoden

3.4.1 Nukleinsäureisolierung aus dem Boden

DNS aus dem Boden wurde durch Verwendung des Fast DNA Spin[®] Kit for soil (QBiogene, Heidelberg, Deutschland) extrahiert. Mikroorganismen aus dem Boden wurden dabei durch die Kombination von Lysematrix und geeigneten Puffern im Homogenisator (FastPrep FP120A, QBiogene, Heidelberg, Deutschland) lysiert. Genomische DNS wurde extrahiert und diese wurde selektiv an eine Silikamatrix gebunden. Durch Waschschriffe wurden Verunreinigungen eliminiert. Es wurde für jede Extraktion 0,5 g Boden eingesetzt und nach Herstellerangabe verfahren.

3.4.2 *In-vitro*-Amplifizierung von DNS mittels Polymerasekettenreaktion

3.4.2.1 Prinzip der PCR (Mullis *et al.*, 1986 ; Saiki *et al.*, 1988)

Die PCR diente der Amplifikation spezifischer DNS-Abschnitte *in vitro*. Zwei, zu jeweils einem DNS-Strang komplementäre Oligonukleotide flankierten den zu amplifizierenden Sequenzabschnitt. Durch das wiederholte Durchlaufen von Amplifikationszyklen (thermische Denaturierung der zu amplifizierenden DNS, Hybridisierung der Oligonukleotide an ihre Zielsequenz, Elongation der 3'-Enden der gebundenen Oligonukleotide durch eine thermostabile Polymerase) erfolgte eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz.

3.4.2.2 Verwendete Oligonukleotid-Primer für PCR- und Sequenzierungstechniken

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo-Electron (Dreieich, Deutschland) bezogen und laut Herstellerangabe in H₂O_{dd} gelöst. Die in dieser Arbeit verwendeten genspezifischen und plasmidspezifischen Oligonukleotid-Primer sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Verwendete Oligonukleotid-Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Targetgen	Referenz
616V	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	16S-rRNS-Gen	Juretschko <i>et al.</i> (1998)
630R	CAK AAA GGA GGT GAT CC	16S-rRNS-Gen	Juretschko <i>et al.</i> (1998)
phnJ1	TVA ARR TNA THG AYC ARG G	<i>phn</i> J-Gen	Engel, pers. Mitteilung
phnJ2	YYK CTT YTY KCG YCC SKC	<i>phn</i> J-Gen	Engel, pers. Mitteilung
phnJoc1	AAR GTR ATM GAY CAR GG	<i>phn</i> J-Gen	Engel, pers. Mitteilung
phnJoc2	CAT YTT YGG ATT RTC RAA	<i>phn</i> J-Gen	Engel, pers. Mitteilung
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G	T7 Promotor	Dunn und Studier (1983)
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	M13 Promotor	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
609V	GGA TTA GAT ACC CBD GTA	16S-rRNS-Gen	Ackermann <i>et al.</i> , 2001
612R	GTA AGG TTY TNC GCG T	16S-rRNS-Gen	Liske, 2002

Abkürzungen:

Primer: V: vorwärts, an den +Strang bindend; R: rückwärts, an den –Strang bindend;

Basensymbole: (IUB, Nomenclature Committee, 1985):

B = C und G und T

D = A und G und T

H = A und C und T

K = G und T

M = A und C

N = A und C und G und T

R = A und G

S = C und G

V = A und C und G

Y = C und T

3.4.2.3 Standardbedingungen zur Amplifizierung von Zielsequenzen

Sämtliche PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Für Standard-PCR-Reaktionen wie die Amplifizierung der gesamten 16S-rRNS-Gensequenz wurde das thermostabile Enzym *Taq* DNS Polymerase, Reaktionspuffer und MgCl₂ von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und Nukleotide von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Pro Reaktionsansatz wurden 50-150 ng Template-DNS, 10-fach-Reaktionspuffer in einer 1-fachen Endkonzentration, 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 25 pmol je Primer 616V und 630R und 0,1 U/μl *Taq* DNS Polymerase

verwendet. Standardreaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl bzw. 100 µl durchgeführt. Die Amplifikationsbedingungen waren: 1. Schritt: 94 °C: 2 Min. (primäre Denaturierung der DNS); 2. Schritt: 94 °C: 1 Min. (Denaturierung der DNS); 3. Schritt: 50 °C: 1 Min. (Annealing der Oligonukleotide); 4. Schritt: 72 °C: 1 Min. (Extension der Primersequenzen); 5. Schritt: 72 °C: 10 Min. (finale Extension) bei einer Zyklenanzahl (Schritt 2 – Schritt 4) von 35.

Zur Ermittlung der optimalen PCR-Bedingungen mit dem Primerpaar *phnJ1/phnJ2* wurden „Touch-down“-PCRs durchgeführt. Bei der so genannten „Touch-down“-PCR (Don *et al.*, 1991) wurde die Annealing-Temperatur von 64 °C schrittweise um je zwei Grad auf 44 °C abgesenkt. Bei jeder Temperatur wurden zwei PCR-Zyklen gefahren. Nach einer primären Denaturierung bei 94 °C für zwei Minuten vor dem ersten Zyklus, umfassten alle weiteren Zyklen eine Denaturierung bei 94 °C für eine Minute, ein Annealing bei 64 °C - 44 °C für eine Minute und eine Extension der Primersequenzen bei einer Temperatur von 72 °C für eine Minute. Bei einer Annealing-Temperatur von 44 °C wurden schließlich 35 PCR-Zyklen ausgeführt, wobei bei dem letzten PCR-Zyklus die Dauer der Extension der Primersequenzen auf zehn Minuten verlängert wurde.

Red GoldStarTM, welche eine 5'→3' Exonukleaseaktivität aufweist, wurde zusammen mit dem mitgelieferten Reaktionspuffer und dem MgCl₂ von Eurogentec (Seraing, Belgien) und mit den Nukleotiden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) in den übrigen PCR-Reaktionen eingesetzt. Zur Amplifikation von *phnJ*-Genfragmenten der Bodenisolat und der Klone der Metagenombank wurden in einem Gesamtansatz von 100 µl pro Reaktionsansatz 50 ng Template DNS, 10-fach-Reaktionspuffer in einer 1-fachen Endkonzentration, 0,2 mM dNTPs, 4 mM MgCl₂, 100 pmol je Primer *phnJ1* und *phnJ2*, 30 µg BSA, 5 % DMSO und 2 U/µl Red GoldStarTM DNS Polymerase verwendet. Die relativ hohe Primerkonzentration wurde gewählt, um zu gewährleisten, dass trotz des hohen Degenerationsgrades der Primer von jeder Variante eine genügend hohe Konzentration zur Verfügung stand. Der unspezifische Enzymstabilisator BSA stabilisierte labile Enzyme wie Polymerasen und hat die Hemmung der PCR durch seine Bindung an Inhibitoren wie Huminstoffe unterbunden. Der Zusatz von DMSO verbesserte die Denaturierung GC-reicher Regionen und half Schwierigkeiten bei der Primerextension durch Sekundärstrukturen der DNS zu überwinden. DMSO trug auch dazu bei, dass die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer stringenter erfolgte. Optimale Amplifikationsbedingungen wurden durch eine primäre Denaturierung der DNS bei

94 °C für zwei Minuten eingeleitet. Eine weitere Denaturierung der DNS bei 94 °C für eine Minute, ein Annealing der Oligonukleotidprimer bei 48 °C (DNS der Bodenisolate) bzw. 44 °C (Klone der Metagenombank) für eine Minute und eine Extension der Oligonukleotidprimersequenzen bei 72 °C für eine Minute erwiesen sich bei einer Zyklanzahl von 35 als optimal. Die finale Extension erfolgte bei 72 °C für zehn Minuten.

Zur Amplifikation von *phnJ*-Genfragmenten im Boden A17 und NM wurden die eben beschriebenen Bedingungen übernommen, wobei eine geringere Primerkonzentration von 0,4 pmol/µl *phnJoc1* bzw. *phnJoc2* eingesetzt wurde. Die Zyklanzahl wurde auf 30 reduziert. Die Annealingtemperatur betrug 48 °C. Die finale Extension wurde auf 30 Min. erhöht. Dies sollte gewährleisten, dass die Red GoldStarTM-Polymerase für die anschließende Klonierung alle Amplifikate mit einem 3'-Desoxyadeninrest versah.

Die hohe Sensitivität der PCR bedingte ein erhöhtes Risiko, Kontaminationen zu vervielfältigen. Zur Kontaminationskontrolle wurde bei jedem Amplifikationsexperiment eine Negativkontrolle ohne den Zusatz von DNS mitgeführt. Amplifizierte DNS Fragmente wurden nach entsprechender Reinigung mit Restriktionsendonukleasen (siehe 3.4.6) behandelt, kloniert (siehe 3.4.4) oder einer Sequenzanalyse (siehe 3.4.11) unterzogen.

3.4.3 Isolierung, Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten

PCR-Amplifikate wurden zur Aufbereitung für eine spätere Sequenzierung (siehe 3.4.11) in präparativen 2 - 4- prozentigen Agarosegelen aufgetrennt (siehe 3.4.7.1), durch Ethidiumbromid unter UV-Licht lokalisiert und als Gelstücke ausgeschnitten. Die Isolierung der DNS-Fragmente aus der Gelmatrix sowie deren Reinigung und Aufkonzentrierung erfolgte durch Verwendung eines kommerziellen Kits (MinElute[®] Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Hierbei wurde die DNS selektiv bei einer hohen Salzkonzentration und einem pH-Wert von 7,5 an eine Silikamembran gebunden, während Kontaminationen wie Proteine, Polysaccharide, Salze und Oligonukleotide nicht an die Membran gebunden wurden und in mehreren Waschschritten entfernt wurden. Aufgereinigte DNS wurde bei höherem pH und geringerer Salzkonzentration von der Säulenmatrix eluiert. Die Vorgehensweise bei der Reinigung und Konzentrierung erfolgte nach Herstellerangabe, wobei ein zusätzlicher Waschschriff mit 750 µl Waschpuffer (PE) eingefügt wurde. Wurde in der PCR (siehe 3.4.2) nur ein spezifisches PCR-Produkt erhalten, wurde dieses direkt aus dem PCR-Ansatz aufgereinigt. Es wurde ein Kit (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland)

verwendet, welches nach dem gleichen Prinzip einer selektiven Bindung der DNS an eine Silikagel-Matrix funktionierte. Die Reinigung und Konzentrierung erfolgte nach Angabe des Herstellers, wobei auch hier ein zusätzlicher Waschschrift mit 750 µl Waschpuffer (PE) eingefügt wurde. Die erfolgte Aufreinigung wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 3.4.7.1) überprüft.

3.4.4 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Ligation von aufgereinigten PCR-Fragmenten (*phnJ*-Genfragmente aus dem schluffigen Boden A17 und dem sandigen Boden NM) mit dem „high copy“ Vektor pCR[®]2.1 (Abb. 7) erfolgte durch Verwendung des TA Cloning[®] Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Der Vektor lag in dem verwendeten Kit bereits in linearisierter Form vor und trug bereits 3'-Desoxythymidinreste. In der PCR wurde mit Hilfe der Red GoldStar[™]-Polymerase an die Produkte der Polymerasekettenreaktion ein 3'-Desoxyadenin gehängt. Durch eine finale Extension von 30 Min. sollte erreicht werden, dass möglichst alle Amplifikate einen 3'-Desoxyadeninrest trugen. Der linearisierte und mit einem 3'-Desoxythymidinrest ausgestattete Vektor wurde mit den mit 3'-Desoxyadenin versehenen Amplifikaten nach Herstellerangaben ligiert. Die Ligationsansätze wurden entsalzt und aufkonzentriert (siehe 3.4.8.6), um sie durch Elektroporation in *E. coli* (TransforMax[™], Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) transformieren zu können (siehe 3.4.8.7). Die Transformanten wurden auf LB-Platten (+ Kanamycin + IPTG + X-Gal, siehe 3.3.1 und 3.3.2) ausplattiert. Die Transformationseffizienz erreichte bei den einzelnen Klonierungen Werte zwischen $2,7 \cdot 10^7$ und $1,2 \cdot 10^8$ cfu/µg ligierte DNS. Rekombinante Klone wurden durch Farbselektion ermittelt.

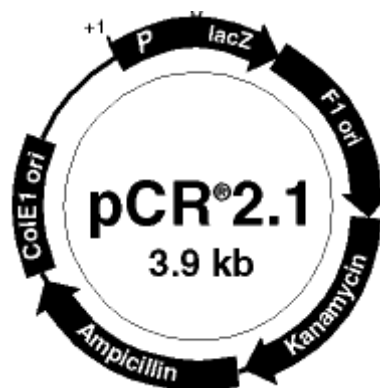


Abb. 7: Karte des Vektors pCR[®]2.1 (http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ta_man.pdf)

3.4.5 Präparation rekombinanter Plasmide

Rekombinante Plasmide wurden durch Verwendung des Plasmid DNA Purification Kits (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Das Prinzip dieser Methode beruhte auf einer SDS-alkalischen Lyse, welche die Plasmid-DNS freisetzte. SDS-Präzipitate und Zelldebris wurden ausgefällt und die Plasmid-DNS wurde selektiv an die Säulenmatrix gebunden. Durch die folgenden Waschschrte wurden Salze, Metabolite und lösliche zelluläre Komponenten entfernt. Die Plasmid-DNS wurde bei geringer Ionenstärke eluiert. Es wurde nach Herstellerangabe verfahren, wobei ein zusätzlicher Waschschrte mit 600 µl Puffer A4 eingefügt wurde. Die aufgereinigten Plasmide wurden anschließend einer Sequenzierung unterzogen (siehe 3.4.11).

3.4.6 Spaltung von DNS mittels Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von DNS-Molekülen wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Zur Abschätzung der Insertgrößen der Klone der Metagenombank wurden von 10 ml Übernachtskultur ausgehend Minipräparationen (siehe 3.4.9.1) der Klone zur Isolierung von Plasmid-DNS hergestellt. Diese wurden im Gesamtansatz einer Restriktion mit *HindIII* unterzogen (5 U *HindIII*, 12 µl Reaktionsansatz). Für die amplifizierte rDNS Restriktionsanalyse (ARDRA) der Bodenisolate wurden die aufgereinigten PCR-Produkte (siehe 3.4.2.3) in einem Doppelverdau mit *AluI* und *MspI* restringiert (je 1 U *AluI/MspI*, 300-500 ng DNS, Puffer Tango™, 10 µl Reaktionsansatz). Die Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend den beiliegenden Produktbeschreibungen zusammen mit den mitgelieferten 10-fach-Puffern verwendet. Die Inkubation bei 37 °C erfolgte für den *HindIII*-Ansatz über Nacht und für den *AluI/MspI*-Ansatz für 10 h. Die Enzyme wurden danach für 20 Min. bei 65 °C inaktiviert.

3.4.7 Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden nach ihrer Wanderung in Agarosegelen in Abhängigkeit von ihrer Masse und Konformation (linear, offenzirkulär bzw. superhelikal) im elektrischen Feld aufgetrennt. Durch Interkalation von Ethidiumbromid in die DNS konnte diese im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden. Sehr geringe DNS-Konzentrationen konnten durch Silberfärbung sichtbar gemacht werden (siehe 3.4.7.3). Analytisch wurde die Gelelektrophorese zur Bestimmung der Größe, Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren eingesetzt. Präparativ diente sie zur Abtrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten bestimmter Größe.

Menge und Größe der DNS konnten über den visuellen Vergleich mit mitgeführtem DNS-Längenstandard (100 bp und 1 kb DNA ladder, GeneRuler™, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) abgeschätzt werden. Alternativ wurde die Konzentration an DNS und RNS mit dem NanoDrop® Spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) bestimmt.

3.4.7.1 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele (Biozym Agarose, Hessisch Oldendorf, Deutschland) wurden in einer Konzentration von 1 - 3 % (wt/vol) in 1 · TAE (Sambrook und Russell, 2001) eingesetzt. DNS-Proben wurden mit 0,1 - 0,3 Vol. Auftragspuffer (0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol, 0,1 M Na₂-EDTA und 70 % Glycerol, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) versetzt. Die Elektrophorese (Spannungsgeber: Bio-Rad Power PAC 300, Bio-Rad, München, Deutschland; Kammer: OWL Separation Systems Inc., Portsmouth, USA) wurde bei 80 V - 120 V mit konstanter Spannung durchgeführt. Gele wurden 20 Min. in Ethidiumbromidlösung (0,015 %, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gefärbt. Die DNS wurde anschließend durch einen Transilluminator (Vilber Lourmat TFX-35.M, Marne-la-Vallée, Frankreich) sichtbar gemacht und dokumentiert (INTAS Geldokumentationsanlage, Mitsubishi P91D, Göttingen, Deutschland).

3.4.7.2 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Größe der integrierten DNS-Fragmente in Metagenombanken erforderte eine besondere Art der Gelelektrophorese. DNS-Fragmente einer Größe von über 40 kb konnten in einem konstanten elektrischen Feld nicht aufgetrennt werden. Durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) war es mittels eines alternierenden elektrischen Feldes möglich, hochmolekulare DNS bis zu 5 Mb aufzutrennen. Wenn sich die Richtung des elektrischen Feldes änderte, mussten sich die DNS-Moleküle neu orientieren, bevor sie in die andere Richtung wandern konnten. Je größer die Fragmente waren, desto mehr Zeit nahm dies in Anspruch (Sambrook und Russell, 2001). Zum Aufschmelzen der Agarose (1 %, Certified™ Molecular Biology Agarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) und als Laufpuffer wurde 0,25 · TBE (Sambrook und Russell, 2001) verwendet. Der Marker (Low Range PFG Marker, New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland) wurde als dünne Scheibe luftblasenfrei in eine Tasche gedrückt und diese wurde mit Low Melting Agarose (Low Melt Preparative Grade Agarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) verschlossen. Alle übrigen Proben

wurden mit 0,3 Volumina Auftragspuffer (siehe 3.4.7.1) versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Laufbedingungen in der Pulsfeldgelelektrophorese (Rotaphor Typ R21, Biometra, Göttingen, Deutschland) umfassten ein Startintervall von 50 Sek., ein Endintervall von 20 Sek., einen linearen Ramp, einen Startwinkel von 110 °, einen Endwinkel von 95 °, eine Rotorgeschwindigkeit von 6 Umdrehungen/Min., eine maximale Temperatur von 14 °C, eine Laufzeit von 24 h, bei 200 V und 150 mA bei einer Gellänge von 20 cm.

3.4.7.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese und Silberfärbung

Polyacrylamidgele wurden zur Detektion von Restriktionslängenpolymorphismen eingesetzt. Gele und Puffer wurden dem CleanGel DNA Analysis Kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) entnommen und den Herstellerangaben zufolge verwendet. Die Elektrophoreseeinheit umfasste die Elektrophoresekammer (Multiphor II) und den Spannungsgeber (Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Der Spannungsgeber wurde, 15 Min. nachdem alle Proben aufgetragen worden waren, gestartet. Die Laufbedingungen betragen 100 V, 23 mA und 5 W, bis die Xylencyanollinie von der Bromphenolblaulinie gerade überholt wurde und anschließend 200 V, 23 mA und 5 W, bis die Bromphenolblaulinie die Anode erreichte.

DNS in Polyacrylamidgelen wurde nach einer modifizierten Version des Protokolls von Heukeshoven und Dernik (1986) durch Silberfärbung angefärbt (Fixierung 2 · 10 Min.: 10 % Ethanol p.a., 0,5 % Eisessig; Silberfärbung 10 Min.: 0,1 % AgNO₃, 0,004 % Formaldehyd; 2 · mit H₂O_{dd} waschen; Entwicklung 5-6 Min.: 1,5 % NaOH, 0,015 % Formaldehyd, 0,01 % NaBH₄; Fixierung 10 Min.: 0,75 % Na₂CO₃, sämtliche Lösungen: Merck, Darmstadt, Deutschland; alle Feststoffe: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), wobei die Lösungen kurz vor jeder Silberfärbung frisch zubereitet wurden.

3.4.8 Erstellen einer Metagenombank

3.4.8.1 Isolierung und Aufreinigung hochmolekularer DNS aus dem Boden

Zum Erstellen der Metagenombank wurde ausschließlich die DNS aus dem Boden vom Standort Neumarkt mit Glyphosatapplikation (NM + Gly) isoliert (siehe 3.1). Der Boden wurde nach der Beendigung des Mikrokosmenexperiments vom Standort NM mit Glyphosatapplikation aus einer Tiefe von 0 – 5 cm entnommen, schockgefroren und bis zur Extraktion bei – 80 °C aufbewahrt. Die DNS wurde nach der Methode von Zhou *et al.* (1996) aus diesem

Boden extrahiert. Modifiziert wurden 10 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl [pH 8,0]; 100 mM Natrium-EDTA [pH 8,0]; 100 mM Natriumphosphat [pH 8,0]; 1,5 M NaCl; 1 % CTAB; NaCl und HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland; alle übrigen Chemikalien Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) pro 5 g aufgetautem Boden vom Standort Neumarkt eingesetzt. 100 µl Lysozym (10 mg/ml in Tris/HCl (pH 8), Sambrook und Russell, 2001) wurden zur Lyse von hauptsächlich grampositiven Bakterien zugesetzt und 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 µl Proteinase K (10 mg/ml gelöst in Extraktionspuffer) zum Entfernen von DNasen und RNasen zugefügt und bei 37 °C für weitere 30 Min. inkubiert. Lysozym (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und Proteinase K (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden für jede Extraktion frisch zubereitet. Nach dem Zusatz von 1,1 ml des Detergens SDS (20 %, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) fanden die Denaturierung von Proteinen und die Lyse von Zellen bei einer Temperatur von 60 °C für 2 h statt. Nach einer Zentrifugation für 10 Min. bei 6000 g wurde der Überstand zur Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen nach dem Zusatz von einem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) bei 16000 g und 4 °C für 20 Min. zentrifugiert. Die DNS aus der wässrigen Phase wurde mit 0,6 Volumina Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) präzipitiert, mit Ethanol gewaschen, in 1 ml H₂O_{dd} resuspendiert und bei -20 °C (Liebherr Comfort, Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland) aufbewahrt.

Die hochmolekulare DNS wurde zur Abtrennung von Huminstoffen, die zusammen mit der DNS aus dem Boden extrahiert wurden und nachfolgende Reaktionen negativ beeinträchtigen könnten, einer präparativen Pulsfeldgelelektrophorese (siehe 3.4.7.2) unterzogen. Huminstoffe liefen in der Elektrophorese schneller als die DNS. Die beiden Ränder des Gels wurden abgeschnitten und zur Lokalisierung der DNS mit Ethidiumbromid gefärbt. Hochmolekulare DNS enthaltende Regionen wurden aus dem Rest des Gels ausgeschnitten und in TE (Sambrook und Russell, 2001) plus PA (0,75 mM Spermin; 0,30 mM Spermidin; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zur Stabilisierung bis zur weiteren Verwendung bei 6 °C aufbewahrt.

Dialyseschläuche (Cellulose-Membran, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden erst einige Stunden mit Wasser gespült und dann nach der Methode von Sambrook und Russell (2001) mit der Modifikation präpariert, dass von Anfang an mit Handschuhen gearbeitet wurde und die Kochzeiten in 2 % (w/v) Natriumbikarbonat (Sigma-Aldrich,

Taufkirchen, Deutschland) plus 1 mM EDTA und in 1 mM EDTA auf 20 Min. verdoppelt wurden. Die hochmolekulare DNS enthaltenden Gelstücke wurden in Dialyseschläuche überführt und mit 0,5 · TBE bedeckt. Die Dialyseschläuche wurden 3 h in 1 l 0,5 · TBE gerührt, um die Pufferbedingungen in den Gelstücken den nachfolgenden Reaktionen anzupassen. Hochmolekulare DNS wurde durch Elektroelution aus den Gelstücken eluiert (Osoegawa *et al.*, 1998). Dabei wurde die Dauer der Elektroelution (100 V; 150 mA; 6 °C) auf 13 h erhöht. Nach Beenden der Elektroelution wurde durch Umpolung für 60 Sek. die DNS von der Dialysemembran abgelöst. Nach einem weiteren Dialyseschritt (1 · TE für 5 h), wurden die Gelstücke aus den Dialyseschläuchen entfernt. Die Lösung in den Dialyseschläuchen wurde durch Dialyse (0,5 · TE + 30 % Polyethylenglykol 8000, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) auf ca. 500 µl aufkonzentriert. Alle Dialyseschritte wurden bei 6 °C durchgeführt.

3.4.8.2 Partieller Restriktionsverdau der aufgereinigten hochmolekularen DNS

Aufgereinigte hochmolekulare DNS wurde einem partiellen Restriktionsverdau unterzogen, um die DNS klonierbar zu machen. In Vorversuchen wurde die Menge an Restriktionsenzym ermittelt, bei der nach dem Verdau die Fragmentgrößen noch sehr groß waren. Im präparativen Restriktionsverdau wurden pro 100 µl Ansatz 60 µl hochmolekulare DNS, 10 µl 10 x Puffer R und 2 Units *Hind*III (MBI Fermentas St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde 10 Min. bei 37 °C inkubiert. Acht Ansätze wurden vereint und mit 160 µl Auftragspuffer (siehe 3.4.7.1) versetzt. Der partielle Restriktionsverdau wurde zur Größenselektion auf ein präparatives Pulsfeldgel (siehe 3.4.7.2) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die beiden Ränder des Gels abgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. DNS-Fragmente einer Größe von 15 – 40 kb wurden aus dem Rest des Gels ausgeschnitten und elektroeluiert (siehe 3.4.8.1). Die partiell verdaute hochmolekulare DNS wurde durch Dialyse in 0,5 · TE + 30 % Polyethylenglykol auf ca. 800 µl aufkonzentriert (siehe 3.4.8.1).

3.4.8.3 Präparation des Vektors pBeloBAC11

Der Vektor pBeloBAC11 wurde wegen seiner Fähigkeit, sehr große DNS Fragmente stabil integrieren zu können, verwendet. Um für die Erstellung der Metagenombank genug „single copy“ Plasmid pBeloBAC11 bereitzustellen, wurden 3 l LB^{Chl} (siehe 3.3.1 und 3.3.2) 1:50 mit einer Tageskultur von *E. coli*/pBeloBAC11 beimpft und über Nacht bei Raumtemperatur

inkubiert. Die Tageskultur wurde mit einer blauen Kolonie *E. coli*/pBeloBAC11 von einer X-Gal/IPTG-Platte (LB + X-Gal + IPTG, siehe 3.3.1 und 3.3.2) beimpft. Aliquots der Zellsuspension wurden zur Bestimmung der Zelldichte bei einer optischen Dichte von 600 nm photometrisch vermessen (Spektr Photometer UV-1202, Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Die Zellen wurden in der späten logarithmischen Wachstumsphase beim Erreichen einer optischen Dichte von 0,77 durch Zentrifugation (10 Min., 5000 g) geerntet. Die Präparation der Plasmid-DNS erfolgte wie im URL bei Rondon *et al.* (2000) beschrieben, wobei 10 ml RNase A (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer Stammlösung von 0,5 mg/ml in 2 · SSC (Sambrook und Russell, 2001) zur Degradation der RNS zugesetzt wurden. Die Plasmid-DNS wurde durch die Verwendung von 4 Qiagen-tip 500 Säulen (Qiagen Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt, mit 0,7 Volumina 100 % Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 18,6 ml TE resuspendiert, wie im Protokoll angegeben. Die resuspendierte Plasmid-DNS wurde bis zum Zusatz von Cäsiumchlorid bei einer Temperatur von 6 °C aufbewahrt.

18,43 ml aufgereinigtes Plasmid pBeloBAC11 wurden mit 20,31 g DNase-freiem Cäsiumchlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) versetzt. Durch Inkubation bei 30 °C wurde das Cäsiumchlorid in Lösung gebracht. 400 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurden zum Sichtbarmachen der DNS im Cäsiumchloridgradienten zugesetzt, gemischt und auf zwei Zentrifugenbecher aufgeteilt. Zur Ausbildung eines Cäsiumchloridgradienten erfolgte die Zentrifugation in einer Beckman-Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) unter Zuhilfenahme eines 75 Ti Rotors bei 201728 g (47500 rpm) für 71 h bei 20 °C. Durch den Cäsiumchloridgradienten werden Verunreinigungen wie Proteine und RNS von der DNS abgetrennt. Ebenso konnte lineare DNS und zirkuläre DNS mit Einzelstrangbruch von DNS, die zirkulär in geschlossener Form vorlag, abgetrennt werden. Unter UV-Licht konnte diese DNS in zwei unterschiedlichen Banden sichtbar gemacht werden. Der Zentrifugenbecher wurde mit zwei Kanülen durchstoßen. Die Kanüle im oberen Bereich des Zentrifugenbeckers diente zur Entfernung des Vakuums. Die untere Bande, die die DNS in geschlossener zirkulärer Form enthielt, wurde über die zweite Kanüle (20 Gauge, Braun, Melsungen, Deutschland) abgeführt. Ethidiumbromid wurde durch sechsmalige Extraktion mit einem gleichen Volumen an wassergesättigtem Isoamylalkohol (Merck, Darmstadt, Deutschland) eliminiert (Sambrook and Russell, 2001). DNS wurde durch den Zusatz von 3 Volumina H₂O und 8 Volumina 100 % Ethanol über Nacht bei 6 °C präzipitiert und somit vom Cäsiumchlorid abgetrennt, wie bei Sambrook und Russell (2001) beschrieben. Die

aufgereinigte Plasmid-DNS wurde am nächsten Tag abzentrifugiert (20000 g, 15 Min.), mit 70 % Ethanol gewaschen, in 2 ml TE aufgenommen und bei - 20 °C aufbewahrt. Zum Pipettieren wurden abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet, um Scherkräfte zu reduzieren.

3.4.8.4 Präparativer Restriktionsverdau von pBeloBAC11

Die aufgereinigte Plasmid-DNS wurde durch Zentrifugation mit Centricon[®] (YM-30, Millipore, Billerica, USA) auf ein Volumen von 380 µl eingengt. Der Vektor (3 µg) wurde durch einen präparativen Restriktionsverdau in einem Gesamtvolumen von 420 µl, wobei 10 Units *Hind*III (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und 42 µl 10 x Puffer R+ eingesetzt wurden, linearisiert. Die Dauer der Restriktion betrug 1 h bei 37 °C. Das Restriktionsenzym wurde anschließend bei 65 °C für 20 Min. inaktiviert. Die verdaute Plasmid-DNS wurde zur Überprüfung der vollständigen Restriktion auf ein Agarosegel aufgetragen. Der linearisierte Vektor wurde durch Extraktion mit demselben Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) vom Restriktionsenzym abgetrennt. Zur besseren Aufreinigung erfolgte eine zweite Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol. Vor der Fällung mit 2 Volumina 100 % Ethanol wurde die wässrige Phase mit 1/10 Volumen 3 M Kaliumazetat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) aufgesalzen. Die Fällung erfolgte für 30 Min. bei - 20 °C.

3.4.8.5 Dephosphorylierung von pBeloBAC11

Zur Eliminierung der 5'-Phosphatgruppe von pBeloBAC11 wurde der Vektor dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung hat die Religation und die Ringbildung des linearisierten Plasmids durch die DNS-Ligase unterbunden. Die gefällte linearisierte DNS wurde in 90 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8) unter dem Zusatz von 10 µl 10 x Puffer resuspendiert und mit 0,5 Units alkalischer Phosphatase (CIP, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 35 Min. bei 37 °C wurden erneut 0,5 Units alkalische Phosphatase zugesetzt und es folgte eine weitere Inkubation für 30 Min. bei 37 °C. Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte durch den Zusatz von Proteinase K. Proteinase K wurde in einer Endkonzentration von 200 µg/ml eingesetzt, EDTA (pH 8) wurde bis zum Erreichen einer Endkonzentration von 15 mM zugefügt und bei 55 °C für 30 Min. inkubiert. Die zweimalige Extraktion der linearisierten und dephosphorylierten DNS und das Aufsalzen erfolgten, wie unter 3.4.8.4 beschrieben. Die DNS wurde über Nacht bei - 20 °C gefällt, abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20 µl TE resuspendiert. Zur

Überprüfung der vollständigen Dephosphorylierung wurde der Vektor mit T4-DNS-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), wie vom Hersteller angegeben, versetzt (siehe 3.4.8.6). Die Religation des Vektors wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 3.4.7.1) überprüft.

3.4.8.6 Ligation von hochmolekularer DNS mit dem Vektor pBeloBAC11

Die T4-DNS-Ligase katalysierte die ATP-abhängige Bildung von Phosphordiesterbindungen zwischen doppelsträngigen DNS-Molekülen mit 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyltermini (Weiss *et al.* 1968). Dieses Enzym diente zur Insertion von partiell verdauter hochmolekularer DNS aus dem Boden in den Vektor pBeloBAC11. Das molare Verhältnis von Insert- und Vektor-DNS betrug 1:1. Insert-DNS, Vektor und H₂O_{dd} wurden 5 Min. bei 65 °C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Es wurden wie vom Hersteller für Ligationen mit überstehenden Enden empfohlen, für 50-400 ng DNS 2 Units T4-DNS-Ligase eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte durch eine Inkubation bei 65 °C für 10 Min. Für ihren Einsatz in der Elektroporation wurden die Ligationsansätze durch Tropfendialyse entsalzt. Die Entsalzung der Ansätze erfolgte nach dem Diffusionsprinzip. Membranfilter (VWP01300, 0,025 µm Porendurchmesser, Millipore, Schwalbach, Deutschland) wurden auf 25 ml 0,5 · TE in einer sterilen Petrischale gesetzt. Die Ligationsansätze wurden auf die Membranfilter aufgetragen und 2,5 h bei 6 °C inkubiert. Zur Aufkonzentrierung wurden die Ligationsansätze anschließend auf Membranfilter auf 25 ml 30 % Polyethylenglycol in 0,5 · TE aufgebracht und so lange bei 6 °C inkubiert, bis sich das Probenvolumen auf ein paar Mikroliter reduziert hatte. Zur Reduzierung von Scherkräften wurden abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet.

3.4.8.7 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden 25 µl kommerziell erhältliche elektrokompente *E. coli* (TransforMaxTM, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit 2 µl Ligationsansatz versetzt und eine Minute auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine eiskalte Küvette (0,1 cm Elektrodenabstand, Bio-Rad, München, Deutschland) überführt. Die Elektroporation fand bei 600 Ω, 1,8 kV und 10 µFa (MicroPulserTM, Bio-Rad, München, Deutschland) statt. Die transformierten Zellen wurden mit 500 µl SOC (Sambrook und Russell, 2001) aus der Küvette gespült. Nach der phänotypischen Expression bei 37 °C für eine Stunde wurde der Ansatz mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) verdünnt und auf LB-Platten

(+ Chloramphenicol + X-Gal + IPTG, siehe 3.3.1 und 3.3.2) ausplattiert. Zur Bestätigung rekombinanter Klone wurden weiße Kolonien erneut auf LB-Platten (+ Chloramphenicol + X-Gal + IPTG) ausgestrichen.

3.4.8.8 Anzucht und Stammhaltung der Klone der Metagenombank

Die Klone der Metagenombank wurden als Duplikat in je 53 Mikrotiterplatten (Nunclon™, 96-Wells, Nunc, Roskilde, Dänemark) angezogen, wobei ein Klon pro Vertiefung mit einem sterilen Zahnstocher in 120 µl LB^{Chl} (siehe 3.3.1 und 3.3.2) überimpft wurde. Die Nummerierung der Klone innerhalb der Mikrotiterplatten erfolgte nach dem Schema: 1A-C3 [1: Nummerierung der Mikrotiterplatte (1 - 53); A: Duplikat (A, B); C: Spalte der Mikrotiterplatte (A - H); 3: Zeilennummerierung der Mikrotiterplatte (1-12)]. Die Stammhaltung der Klone der Metagenombank erfolgte durch den Zusatz von 70 µl 90 % Glycerin pro Vertiefung zu jedem angewachsenen Klon. Die Metagenombank wurde bei – 80 °C aufbewahrt.

3.4.9 Charakterisierung der Metagenombank

3.4.9.1 Bestimmung der Insertgrößen

Zur Charakterisierung der Metagenombank wurden 110 Klone zufällig ausgewählt. Jeder Klon wurde in 10 ml LB^{Chl} (siehe 3.3.1 und 3.3.2) angezogen. Die rekombinanten Plasmide wurden mittels Plasmid-Präparationskit (Plasmid Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Der Zellaufschluss erfolgt hierbei durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Die Abtrennung der Plasmid-DNS von Proteinen, Nukleotiden und Polysacchariden wurde durch Säulenchromatographie erzielt. Das Standardprotokoll wurde dahingehend modifiziert, dass zum Resuspendieren und zur Lyse der Zellen die doppelte der angegebenen Puffermenge eingesetzt wurde. Die DNS wurde von der Anionenaustauschersäule mit auf 65 °C vorgewärmtem Puffer eluiert. Die in TE aufgenommene extrahierte Plasmid-DNS wurde zur besseren Lösung über Nacht bei 6 °C inkubiert und bei – 20 °C aufbewahrt. Die rekombinanten Plasmide wurden im Gesamtansatz mit dem Restriktionsenzym *HindIII* (MBI Fermentas St. Leon-Rot, Deutschland) verdaut (siehe 3.4.6). Die vollständig verdaute Plasmid-DNS wurde mit 2 µl Auftragspuffer (siehe 3.4.7.1) versetzt, über eine Pulsfeldgelelektrophorese (siehe 3.4.7.2) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (siehe 3.4.7.1) sichtbar gemacht.

3.4.9.2 Charakterisierung der Gene der Metagenombank (Endsequenzierungsansatz)

Zur Charakterisierung der Gene der Metagenombank wurden 114 weitere Klone zufällig ausgewählt. Diese wurden jeweils in 2 ml LB^{Chl} (siehe 3.3.1 und 3.3.2) über Nacht angezogen. Die rekombinanten Plasmide wurden wie eben beschrieben (siehe 3.4.9.1) durch Verwendung eines Plasmid-Präparationskits (Plasmid Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen. Anschließend wurde ein Insertionsende eines jeden Plasmids unter Verwendung des Oligonukleotidprimers T7 (siehe 3.4.2.2) ansequenziert (siehe 3.4.11).

Von den 105 Sequenzen (siehe Anhang 3) des Endsequenzierungsansatzes, die ein Insert enthielten, wurde in der "Biology Workbench 3.2" die Sequenz des Vektors entfernt und mit dem Programm NASTATS der G + C-Gehalt berechnet. Die Nukleinsäuresequenzen dieser ansequenzierten Klone wurden durch "ExPASy" in Aminosäuresequenzen übersetzt und durch das Programm COGnitor (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/xognitor.html>) mit dem zur Verfügung stehenden Datensatz verglichen und Klustern orthologer Gruppen (COG) zugeordnet. Voraussetzung für die Zuordnung einer Aminosäuresequenz zu einer COG-Kategorie war, dass die entsprechende COG-Kategorie ein Protein aus mindestens drei phylogenetisch entfernten Genomen umfasste (Tatusov *et al.*, 1997). Orthologe Gene besitzen normalerweise dieselbe Funktion. Dies erlaubt die Übertragung funktioneller Informationen von einem Mitglied auf die gesamte COG. Auf diese Weise kann eine ganze Reihe von funktionellen Vorhersagen für wenig charakterisierte Genome getroffen werden (Tatusov *et al.*, 1997).

3.4.10 Screening der Metagenombank

3.4.10.1 Funktionelles Screening der Metagenombank

3.4.10.1.1 Vorscreening der Metagenombank

Die Klone der Metagenombank wurden auf ihre Fähigkeit, Glyphosat als alleinige P-Quelle zu nutzen, untersucht. Dazu wurden alle Klone einem Wachstumstest unterzogen. Zunächst wurden sämtliche Klone der DNS-Bibliothek auf LB^{Chl}-Platten angezogen (siehe 3.3.1 und 3.3.2). In einem weiteren Schritt wurden diese Klone in Flüssigmedium in Mikrotiterplatten (NunclonTM, 96-Wells, Nunc, Roskilde, Dänemark) überimpft. Ein Klon wurde pro Vertiefung in 200 µl Medium resuspendiert. Bei dem Medium handelte es sich um ein modifiziertes MOPS-Medium, in dem nach dem Zusatz von Phosphat auch *E. coli* wachsen

konnte. Das verwendete Medium unterschied sich von dem in 3.3.1 beschriebenen dadurch, dass die doppelte Menge an den aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin, NaCl (0,5 %), Leucin (0,006 %) und eine größere Menge an Glucose (1,52 %) eingesetzt wurde. Das Medium enthielt Chloramphenicol an Stelle von Cycloheximid, um eine Ausdünnung der rekombinanten Plasmide zu inhibieren. Das Medium wurde sterilfiltriert. Alle Klone wurden jeweils mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und erst in MOPS-Medium resuspendiert, das als alleinige P-Quelle 1,5 mM Glyphosat enthielt und dann in MOPS-Kontrollmedium resuspendiert, welches neben 1,5 mM Glyphosat auch 1,5 mM K_2HPO_4 enthielt. Dieses Kontrollmedium sollte als Wachstumsreferenz dienen. Als Kontrollorganismen wurden *E. coli* und *E. coli*/pBeloBAC11 eingesetzt. Die Mikrotiterplatten wurden zur Verhinderung von Verdunstungsverlusten mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA) umwickelt und bei 37 °C und 125 UpM (Inkubationsschüttler, Certomat®, Braun, Melsungen, Deutschland) inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach einer Inkubationszeit von einem bis acht Tagen per Auge und durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 630 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Microplate Reader MR4000, Dynatech, Guernsey, Großbritannien). Mit potenziell positiven Klonen wurde der Versuch wiederholt. Die Inkubation der Mikrotiterplatten wurde hierbei auf eine Temperatur von 30 °C oder auf Raumtemperatur reduziert. Dies sollte gewährleisten, dass die Enzymaktivitäten in ihrem Temperaturoptimum erfolgten, da die Donor-DNS aus dem Boden stammte.

3.4.10.1.2 INT-Test

Das Tetrazoliumsalz Iodonitrotetrazoliumviolett (INT), welches als künstlicher Elektronenakzeptor Elektronentransportaktivitäten durch Farbumschlag anzeigte, wurde zur Erleichterung der Auswertung zugesetzt. Im oxidierten Zustand war INT farblos, im reduzierten Zustand rot. INT wurde durch intakte Dehydrogenasen lebender Organismen reduziert. Die im Vorscreening ermittelten potenziell positiven Klone wurden einem weiteren Test unterzogen. In drei parallelen Ansätzen wurde je ein Klon pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte erst in 200 µl modifiziertem MOPS-Medium (siehe 3.4.10.1.1) ohne jegliche P-Quelle, dann in modifiziertem MOPS-Medium mit 1,5 mM Glyphosat als alleiniger P-Quelle und anschließend in MOPS-Kontrollmedium mit 1,5 mM Glyphosat und 1,5 mM K_2HPO_4 resuspendiert und bei Raumtemperatur und 150 UpM (Inkubationsschüttler, Certomat®, Braun, Melsungen, Deutschland) inkubiert. Durch diesen Inkubationsschritt sollten Teilungen aufgrund von in den Mikroorganismen vorhandenen Phosphatspeichern vorweggenommen

werden. Nach 6 – 7 Tagen wurden 2,5 µl INT (4 mg/ml) pro Vertiefung zugefügt und resuspendiert. Die Mikrotiterplatten wurden mit Parafilm umwickelt und weitere 6 – 7 Tage bei 37 °C bzw. bei Raumtemperatur inkubiert. Da Sauerstoff ein besserer Elektronenakzeptor als INT ist, wurde nach INT-Zugabe auf das Schütteln verzichtet. Als Kontrollorganismen fungierten *E. coli* und *E.coli*/pBeloBAC11. Die Auswertung des Farbumschlages erfolgte per Auge und durch Messung der optischen Dichte im Microplate Reader (Microplate Reader MR4000, Dynatech, Guernsey, Großbritannien) bei einer Wellenlänge von 490 nm.

Die Bodenisolat wurden mit demselben Test mit der Modifikation gescreent, dass das unter 3.3.1 beschriebene Medium verwendet wurde. Dem Medium wurde zum einen in der Negativkontrolle kein Phosphat, zum anderen Glyphosat (0,5 mM bzw. 1,5 mM) oder in der Positivkontrolle Glyphosat und K_2HPO_4 (jeweils 0,5 mM bzw. 1,5 mM) zugesetzt. Die Inkubation nach INT-Zugabe erfolgte bei Raumtemperatur (Abb. 8).

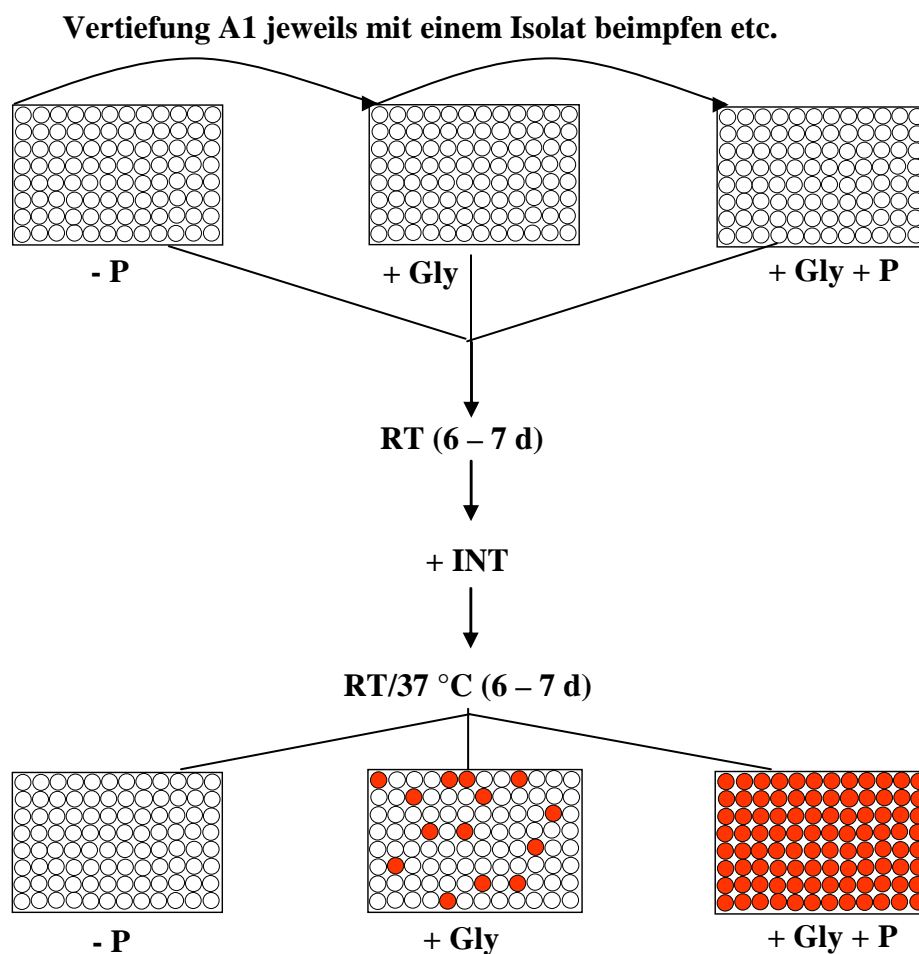


Abb. 8: Versuchsdesign INT-Test; zum Glyphosatabbau befähigte Isolate: kein Farbumschlag bei - P; Farbumschlag bei + Gly und + Gly + P; P: Phosphat, Gly: Glyphosat

3.4.10.1.3 Glyphosatanalytik

Ausgewählte Bodenisolate und Klone der Metagenombank wurden daraufhin untersucht, ob durch ihr Wachstum die Glyphosatkonzentration im Medium abnahm. Das Medium (siehe 3.4.10.1.1) in dem die Vorkulturen inokuliert wurden, enthielt an Stelle von Glyphosat 1,5 mM K_2HPO_4 . Für die Vorkulturen der Isolate und Kontrollen wurde auf den Zusatz von Cycloheximid verzichtet. Dem Medium, in dem die ausgewählten Klone der Metagenombank angezogen wurden, wurde Chloramphenicol (siehe 3.3.2) zugesetzt. 5 ml Vorkulturen wurden mit einer Kolonie beimpft und bei Raumtemperatur inkubiert, bis gutes Wachstum zu verzeichnen war. Die Vorkulturen wurden bei 18626 g (14000 UpM, Micro 200R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) abzentrifugiert und Medienreste wurden entfernt. Die Bakterien wurden in einem Milliliter phosphat- und glyphosatfreiem MOPS-Medium resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift zur Entfernung von Phosphat wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Anschließend wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Die 100 ml-Erlenmeyerkolben aus Glas, in denen die Hauptkulturen angezogen wurden, wurden vor ihrer Verwendung mit 1 M HCl gespült und mit H_2O_{dd} nachgespült, um sie phosphatfrei zu machen. Für die Hauptkulturen wurde dem Medium an Stelle von K_2HPO_4 1,5 mM Glyphosat zugesetzt. Die Hauptkulturen wurden in Triplikaten 1:50 mit den gewaschenen Vorkulturen mit einer optischen Dichte von 0,8 angeimpft und 14 Tage lang bei Raumtemperatur und 125 UpM (Inkubationsschüttler, Certomat[®], Braun, Melsungen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Hauptkulturen abzentrifugiert (6000 g, 10 Min., Kendro 1.0R Megafuge, Thermo Electron, Langenselbold, Deutschland) und der Überstand wurde sterilfiltriert (Nylonfilter, 0,2 μ m Porengröße, neoLab, Heidelberg, Deutschland). Die Isolate und Kontrollen, die Polysaccharide abgeschieden hatten, wurden bei 18626 g (14000 UpM, Micro 200R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) abzentrifugiert und der Überstand wurde durch Verwendung von 5 μ m-Filtern (Minisart, Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert. Als Negativkontrollen wurde nicht-inokuliertes Medium und *Escherichia coli* mitgeführt. *Arthrobacter atrocyaneus* wurde als potenzielle Positivkontrolle verwendet. Die Vorkulturen wurden dabei in den von der DSMZ empfohlenen Medien angeimpft. Die Glyphosatanalytik wurde von dem Analytik Institut Rietzler (Nürnberg, Deutschland) durchgeführt.

3.4.10.2 Screening der Metagenombank auf DNS-Ebene

Die im Präscreening ermittelten potenziell positiven Klone wurden einem weiteren Screening auf DNS-Ebene unterzogen. Von 10 ml Übernachtskultur in LB^{chl} (siehe 3.3.1 und 3.3.2) ausgehend wurden die rekombinanten Plasmide der potenziell positiven Klone mittels Plasmid-Präparationskit (Plasmid Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen (siehe 3.4.9.1). Zur Amplifizierung des Gens *phnJ*, welches Teil des C-P-Lyase Operons ist, wurde die DNS (je 10 – 50 ng) von jeweils 10 Minipräparationen potenziell positiver Klone vereinigt. Durch den Einsatz des degenerierten Primerpaares *phnJ1/phnJ2* (siehe 3.4.2.2) in der PCR (siehe 3.4.2.3) sollten mögliche glyphosatspezifische C-P-Lyasegene detektiert werden. Als Positivkontrolle fungierte chromosomale DNS (50 ng) von *Oceanobacillus iheyensis* für das Primerpaar *phnJ1/phnJ2*. Zur Verifizierung, dass es sich bei den Amplifikaten tatsächlich um *phnJ*-Genfragmente handelte, wurden diese aufgereinigt (siehe 3.4.3) und unter Verwendung des Oligonukleotidprimers *phnJ1* sequenziert (siehe 3.4.11).

3.4.11 Sequenzanalyse, Auswertung der Sequenzdaten und Rekonstruktion von Stammbäumen

Die Sequenzierung der 16S-rRNS-Genfragmente der Bodenisolatate wurde mit den Primern 609V, 612R, 616V und 630R (siehe 3.4.2.2) durchgeführt (siehe Anhang 1). Die *phnJ*-Genfragmente der Bodenisolatate wurden unter Verwendung des Primers *phnJ1* (siehe 3.4.2.2) sequenziert (siehe Anhang 2). Die Sequenzierung der *phnJ*-Genfragmente aus dem Boden erfolgte mit dem Primer M13R (siehe 3.4.2.2; Anhang 4). Die Sequenzanalysen wurden extern durch die Firma Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) durchgeführt.

Die gewonnenen Sequenzen wurden mit Nukleinsäuresequenzen der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) mittels des Programms Blast in Beziehung gesetzt (Altschul *et al.*, 1997). Im Falle der Sequenzen der 16S-rRNS-Gene wurden die Nukleinsäuresequenzen mit dem Programm BlastN mit den verfügbaren Nukleinsäuresequenzen der NCBI-Datenbank abgeglichen. In allen übrigen Fällen (PhnJ-Sequenzen der Bodenisolatate, Endsequenzierungsansatz der Metagenombank, PhnJ-Sequenzen aus dem Boden) wurden die DNS-Sequenzen in Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung sämtlicher Leserahmen und ihrer Orientierung translatiert und anschließend mit den zur Verfügung stehenden Proteinsequenzen der NCBI-Datenbank verglichen. Dies erfolgte mit dem Programm BlastX.

Um phylogenetische Aussagen zu ermöglichen, wurden die erhaltenen Sequenzen in ein Alignment bereits bekannter Sequenzen eingepasst. Die Sequenzen wurden dazu so angeordnet, dass sich homologe Positionen an denselben Stellen befanden. In den variablen Sequenzbereichen des Alignments der 16S-rRNS-Gensequenzen dienten Sekundärstrukturanalysen und Gruppen konservierter Basenfolgen als Orientierung bei der Bestimmung homologer Positionen. Die Rekonstruktion und die optimale Darstellung der phylogenetischen Bäume auf 16S-rRNS-Genen basierend, erfolgte mit dem Programm ARB (Strunk und Ludwig, 1997; TU-München, München, Deutschland). Die Rekonstruktion der phylogenetischen Bäume für die 16S-rRNS-Gene wurde nach der Maximum Likelihood- und Distanzmatrix- (Neighbour-Joining) Methode durchgeführt.

Die "Biology Workbench 3.2" (<http://workbench.sdsc.edu/>, SDSC, University of California, San Diego, USA) diente als Forum zum Erstellen der übrigen Alignments und der restlichen phylogenetischen Bäume. Das Alignment der *phnJ* Sequenzen wurde mit dem Programm "CLUSTAL W" (www.ebi.ac.uk/clustalw, SDSC, University of California, San Diego, USA) durchgeführt. Die auf *phnJ*-Sequenzen basierenden phylogenetischen Bäume wurden mit dem Programm "DRAWGRAM PHYLIP rooted phylogenetic tree" (SDSC, University of California, San Diego, USA) erstellt. Zum Erstellen von phylogenetischen Bäumen, die auf Aminosäuresequenzen (PhnJ-Sequenzen) beruhten, wurde zunächst durch Verwendung von "ExPASy" (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) der richtige Leserahmen ermittelt. Anschließend wurden die phylogenetischen Bäume der PhnJ-Sequenzen mit dem Programm "DRAWGRAM PHYLIP rooted phylogenetic tree" berechnet. Die Algorithmen, die den Alignments und den phylogenetischen Bäumen zugrunde gelegt wurden, wurden von Higgins *et al.* (1992), Thompson *et al.* (1994) und Felsenstein (1989) definiert. Die Programme, die der Kalkulation der Alignments und der phylogenetischen Bäume als Grundlage dienten, waren "CLUSTAL W" (Thompson *et al.*, o. J.) und "PHYLIP" (Felsenstein, 1993).

Virtuelle Polymerasekettenreaktionen wurden mit dem Programm Genomatix (<http://www.genomatix.de>, Genomatix Software, München, Deutschland) durchgeführt.

3.4.12 Rarefactionkurven

Rarefactionkurven wurden verwendet, um die Vollständigkeit der Beprobung eines Habitats abzuschätzen. Rarefactionkurven wurden dabei mit der Software Analytic Rarefaction 1.3 (<http://www.uga.edu/~strata/software/Software.html>, S. M., Holland, UGA Stratigraphy Lab.,

Athens, USA) erstellt. Die Distanzmatrizen der *phnJ*-Sequenzen und der *PhnJ*-Sequenzen zur Anfertigung der Rarefactionkurven wurden ebenfalls in der "Biology Workbench 3.2" erstellt. Die Algorithmen, welche der Berechnung der Distanzmatrizen als Basis dienten, wurden von Higgins *et al.* (1992) und von Thompson *et al.* (1994) dargelegt. Das der Berechnung der Distanzmatrizen zugrunde gelegte Programm war "CLUSTAL W" (Thompson *et al.*, o. J.).

4. Ergebnisse

4.1 Effekt der Glyphosataufbringung auf Gasemissionen im Mikrokosmenexperiment

Ein Ziel des Mikrokosmenexperiments (siehe 3.1) war es, den Einfluss der Applikation von Glyphosat auf die Bodenmikroflora zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde als Indikator für die mikrobielle Aktivität die Emission der Spurengase Kohlendioxid (aerobe Atmung), Lachgas (anaerobe Atmung, Denitrifikation, Nitrifikation) und Methan (anaerobe Atmung, Methanogenese) ermittelt (Abb. 9).

Der Verlauf der Gasemissionen der Bodenproben aus Scheyern (schluffiger Boden), im Folgenden mit A17 abgekürzt, und aus Neumarkt, nachfolgend mit NM (sandiger Boden) bezeichnet, war sehr ähnlich. Die Gasemissionen wurden hauptsächlich durch die Beregnung beeinflusst. Nach den Beregnungen war bei beiden Böden ein Anstieg von CO_2 zu verzeichnen. Dieser Anstieg war sowohl bei den mit Glyphosat beaufschlagten als auch bei den Kontrollmikrokosmen zu beobachten. Dies deutete auf eine optimale Wasserversorgung nach der Beregnung hin. Ebenso wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Beregnung und dem Anstieg der N_2O -Emissionen gemessen. Dies könnte darauf hinweisen, dass sich durch die Beregnung an einigen Stellen im Boden anaerobe Mikrosites ausgebildet haben. Der Verlauf der CH_4 -Emissionen wies neben dem geringeren Anstieg nach den Beregnungen zusätzlich größere Schwankungen auf. Durch abnehmende Feuchtigkeit zwischen den Beregnungen wurden alle drei gemessenen Aktivitäten verringert.

Standortspezifische Unterschiede zwischen den beiden Böden konnten anhand der Spurengasmessung ermittelt werden. Die größten Unterschiede zwischen dem schluffigen Boden A17 und dem sandigen Boden NM wurden bei der Emission von N_2O identifiziert. NM wies mit Maximalwerten in den mit Glyphosat beaufschlagten Mikrokosmen von $0,011 \mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (08. Dez.) und $0,013 \mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (15. Dez.) im Vergleich zum A17-Boden mit Maximalwerten von $0,009 \mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (08. Dez. und 15. Dez.) eine signifikant höhere N_2O -Emission auf. Ebenso war die CO_2 -Freisetzung bei NM tendenziell höher als bei A17. Die CH_4 -Emissionen waren bei beiden Böden nahezu identisch.

Der Vergleich der Mikrokosmen mit und ohne Glyphosatbeaufschlagung zeigte, dass durch den Zusatz von Glyphosat bei NM (sandiger Boden) erwartungsgemäß die CO_2 -Freisetzung

anstieg. Bei A17 (schluffiger Boden) konnte dagegen kein Anstieg der CO_2 -Emission nach der Glyphosatapplikation beobachtet werden. Durch die Beaufschlagung von Glyphosat erhöhte sich die N_2O -Emission beider Böden. Dies deutete auf eine durch das Herbizid induzierte Stressantwort der Mikroflora hin. Unbeeinflusst vom Glyphosatzusatz blieben die CH_4 -Emissionen der beiden untersuchten Böden.

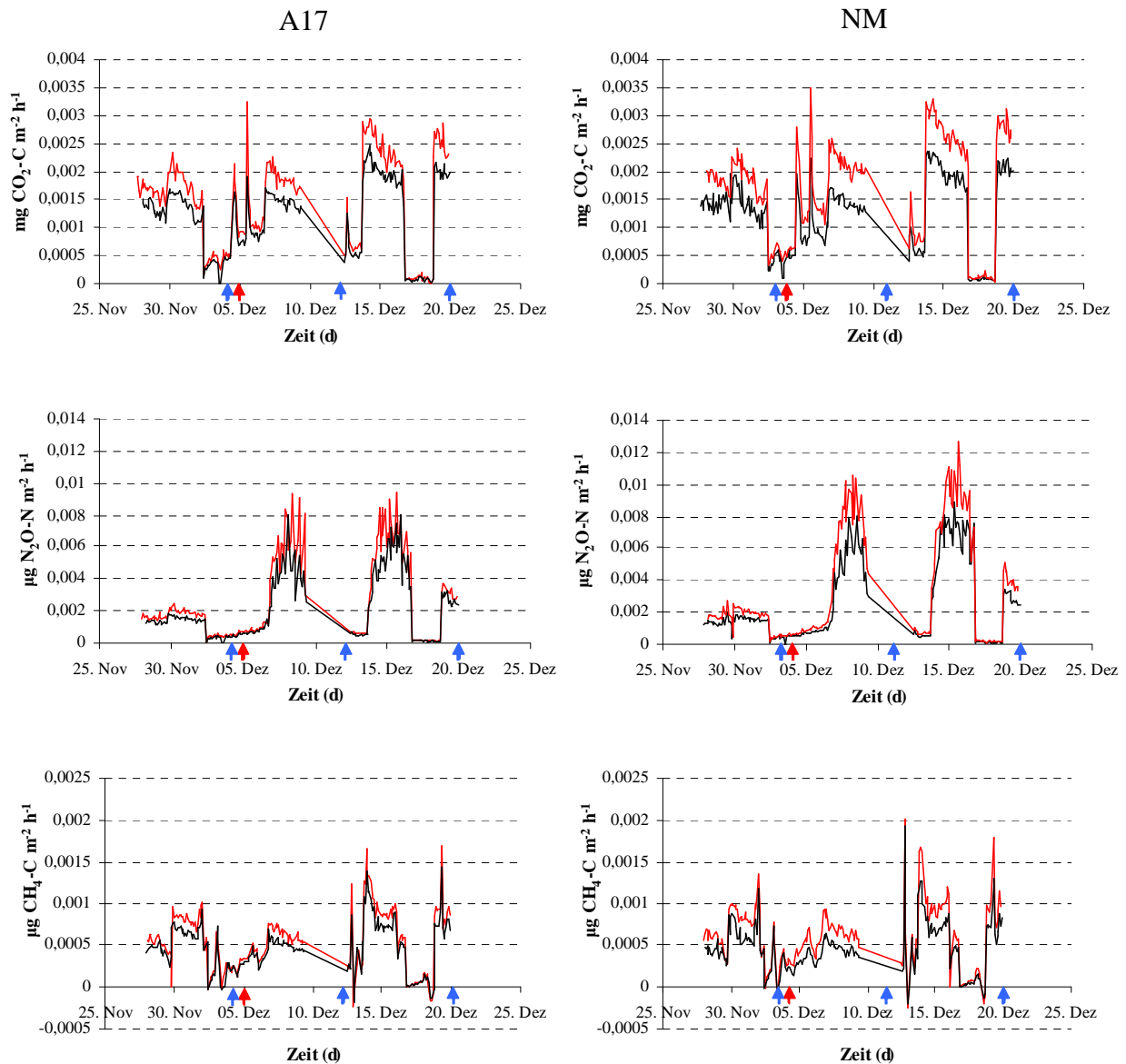


Abb. 9: Verlauf der Gasemissionen (CO_2 , N_2O , CH_4) der Mikrokosmen befüllt mit Boden aus Scheyern (A17, linke Spalte) und Neumarkt (NM, rechte Spalte); mit (rot) und ohne (schwarz) Glyphosatbeaufschlagung; Beregnungszeitpunkte: blaue Pfeile; Zeitpunkt der Glyphosatapplikation: roter Pfeil

4.2 Kultivierungsabhängiger Ansatz: Isolierung und Identifizierung glyphosatabbauender Bakterien

4.2.1 Isolierung glyphosatabbauender Bakterien

In dem Mikrokosmenexperiment konnten durch die Applikation von Glyphosat selektive Bedingungen für die Anreicherung glyphosatabbauender Bakterien geschaffen werden. In den Vorversuchen zeigte sich, dass festes MOPS-Medium alleine zur Isolierung glyphosatabbauender Bakterien ungeeignet war, da Agar und Agarersatzstoffe wie Gelrite[®] Spuren von Phosphat enthielten, die auch das Wachstum von Bakterien ermöglichten, die nicht Glyphosat als Phosphatquelle nutzten. Auf den Kontrollplatten, denen keine Phosphatquelle zugesetzt wurde, konnte durch Optimierungsmaßnahmen (siehe 3.3.1) wie die Verwendung von zweifach deionisiertem Wasser, die Reduzierung der C-Quellen auf D-Glucose und Vorspülen der Gefäße mit Salzsäure erfolgreich das Bakterienwachstum beim sandigen Boden NM um 32 % und beim schluffigen Boden A17 um 41 % reduziert werden. Durch den Vergleich der Kontrollplatten mit den Platten, denen Glyphosat zugesetzt worden war, konnte die Zahl der glyphosatabbauenden Isolate auf etwa 20 – 40 % abgeschätzt werden.

Morphologisch unterschiedliche Bakterienkolonien wurden ausgewählt. Aus dem Bodenextrakt von NM wurden auf diese Weise 53 Bakterien, aus dem Bodenextrakt von A17 50 Bakterien isoliert. Diese wurden zunächst identifiziert und anschließend in weiteren Versuchen auf ihre Fähigkeit, Glyphosat als einzige Phosphatquelle zu nutzen, untersucht.

4.2.2 Identifizierung potenziell glyphosatabbauender Bakterien

Zur Identifizierung der auf MOPS-Medium angereicherten Bakterien wurden zunächst die 16S-rRNS-Gene amplifiziert (siehe 3.4.2.3). Diese wiesen die erwartete Länge von ca. 1500 bp (*E. coli* 1541 bp) auf (Abb. 10). Durch RFLP konnten die Bakterienisolate aufgrund übereinstimmender Bandenmuster von 50 auf 15 (A17, schluffiger Boden) und von 53 auf 13 (NM, sandiger Boden) reduziert werden (Abb. 11). Die 16S-rRNS-Gene der phylogenetisch unterschiedlichen Isolate wurden sequenziert (Tab. 6), wobei bei einer Übereinstimmung von über 97 % eine Zugehörigkeit zur gleichen Spezies angenommen wurde (Stackebrandt und Goebel, 1994).

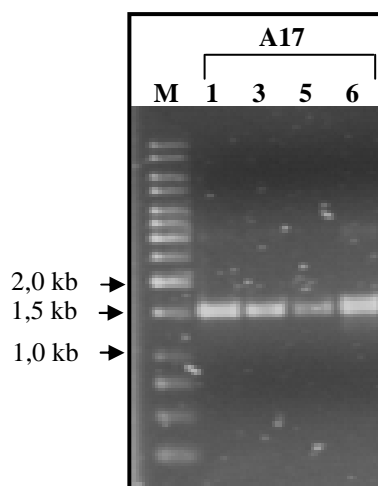


Abb. 10: Aufgereinigte 16S-rRNS-Genfragmente ausgewählter Isolate; M: 1 kb Marker

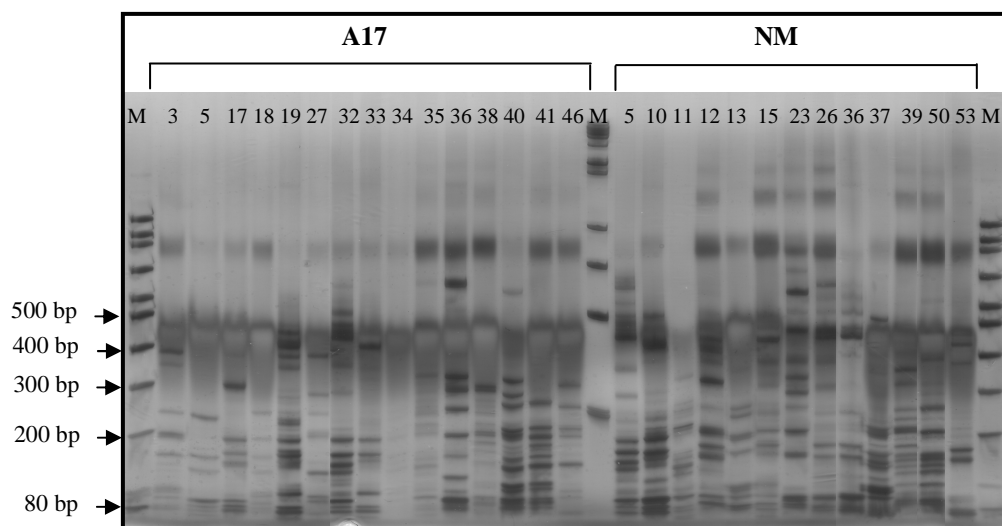


Abb. 11: 16S-rRNS-Genamplifikate der Isolate A17 und NM nach Doppelverdau mit *AluI* und *MspI*; M: 100 bp Marker

Das in dieser Arbeit verwendete MOPS-Medium begünstigte interessanterweise das Wachstum grampositiver Bakterien. Aus beiden Böden wurde ein ähnliches Artenspektrum isoliert. Am häufigsten wurden Bakterien isoliert, die phylogenetisch ähnlich zur Gattung *Paenibacillus* waren. Bakterien, die phylogenetische Ähnlichkeiten mit den endosporenbildenden Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus*, und mit den gramnegativen Gattungen *Sinorhizobium* und *Pseudomonas* hatten, wurden sowohl aus A17 (schluffiger Boden) als auch aus NM (sandiger Boden) isoliert. Nur aus A17 wurden Bakterien mit phylogenetischen Ähnlichkeiten zu den Gattungen *Actinobacterium*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* und *Sphingomonas* isoliert. Ausschließlich aus NM hingegen wurden Bakterien, die Ähnlichkeiten mit den Gattungen *Nocardia* und *Burkholderia* hatten, isoliert.

Tab. 6: Ergebnisse der Sequenzierungen der 16S-rRNS-Genamplifikate

A17		
Isolat	Spezies	Ähnlichkeit
A17:38	<i>Actinobacterium</i> EC5 AY337600	100 %
A17:18	<i>Arthrobacter globiformis</i> M23411	99 %
A17:34	<i>Arthrobacter</i> sp. AJ864856	99 %
A17:17	<i>Bacillus drentensis</i> AJ542506	99 %
A17:36	<i>Bacillus megaterium</i> AJ717381	99 %
A17:19	<i>Paenibacillus</i> sp. AM162314	99 %
A17:32	<i>Paenibacillus</i> sp. AM162318	97 %
A17:33	<i>Paenibacillus</i> sp. AM162314	99 %
A17:3	<i>Pseudomonas</i> sp. DQ453821	99 %
A17:40	<i>Rhizobium gallicum</i> AY509211	99 %
A17:41	<i>Rhizobium gallicum</i> AY509211	99 %
A17:35	<i>Rhodococcus</i> sp. AB204817	99 %
A17:27	<i>Sphingomonas xenophaga</i> AY611716	100 %
A17:46	<i>Sphingomonas xenophaga</i> AY611716	100 %
A17:5	nicht kultiviertes Bakterium AY661985	98 %
NM		
Isolat	Species	Ähnlichkeit
NM:12	<i>Bacillus niacini</i> AB021194	99 %
NM:23	<i>Bacillus simplex</i> AJ628743	100 %
NM:39	<i>Burkholderia glathei</i> U96935	98 %
NM:50	<i>Burkholderia hospita</i> AY040365	99 %
NM:11	<i>Nocardia globerula</i> AF430065	100 %
NM:5	<i>Paenibacillus alginolyticus</i> AB073362	98 %
NM:36	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> AM237394	99 %
NM:10	<i>Paenibacillus</i> sp. AM162336	99 %
NM:15	<i>Paenibacillus</i> sp. DQ407280	98 %
NM:26	<i>Paenibacillus</i> sp. DQ407278	99 %
NM:53	<i>Paenibacillus</i> sp. AM162345	98 %
NM:13	<i>Pseudomonas fluorescens</i> AY538263	99 %
NM:37	<i>Rhizobium gallicum</i> AY509211	99 %

Die isolierten Bakterien wurden anschließend in einem funktionellen Screening auf ihre Glyphosatabbaufähigkeit untersucht.

4.3 Glyphosatabbaufähigkeit der aus A17 und NM isolierten Bakterien

4.3.1 Wachstum in Flüssigmedium

Die Fähigkeit der Isolate zum Glyphosatabbau wurde zunächst durch Wachstum in Flüssigmedium mit Glyphosat als einziger Phosphatquelle untersucht (siehe 3.3.1). Die Dauer bis zum Erreichen einer bestimmten Bakteriendichte schwankte zwischen zwei und vierzehn Tagen. Zwei der Isolate, die phylogenetische Ähnlichkeiten mit *Bacillus* (A17:36, NM:23) und zwei Isolate, die phylogenetische Ähnlichkeiten mit *Paenibacillus* (A17:19, A17:33) aufwiesen, konnten in diesem Flüssigmedium nicht wachsen (Tab. 7). Viele Isolate zeigten auch nach einer längeren Inkubationszeit nur schwaches Wachstum. Daher wurde zur Vereinfachung der Auswertung ein Schnelltest entwickelt, der bakterielle Aktivität durch einen Farbumschlag anzeigte.

Tab. 7: Wachstum der Isolate in Flüssigkultur mit Glyphosat (0,5 mM bzw. 1,5 mM) als einziger P-Quelle; +: sichtbares Wachstum nach 1 – 4 Tagen; (+): schwaches Wachstum nach 5 – 9 Tagen; -: kein Wachstum

A17		NM	
Isolat	Wachstum	Isolat	Wachstum
3	(+)	5	+
5	(+)	10	(+)
17	+	11	(+)
18	(+)	12	+
19	-	13	(+)
27	(+)	15	+
32	+	23	-
33	-	26	(+)
34	+	36	(+)
35	+	37	(+)
36	-	39	(+)
38	(+)	50	(+)
40	(+)	53	(+)
41	(+)		
46	(+)		

4.3.2 INT-Test

In der vorliegenden Arbeit wurde ein INT-Test in Mikrotiterplatten entwickelt (siehe 3.4.10.1.2). Mit Hilfe dieses Schnelltests konnten anhand des Farbumschlags bakterielle Isolate identifiziert werden, die Glyphosat als einzige Phosphatquelle nutzen konnten (Abb. 8). Die Durchführung des INT-Tests in Mikrotiterplatten ermöglichte einen schnellen Durchsatz einer sehr großen Anzahl an Isolaten und die Auswertung in einem Lesegerät für Mikrotiterplatten.

Bei einer Glyphosatkonzentration von 0,5 mM konnten vier Isolate (NM:5, NM:39, A17:32, A17:41) bei 1,5 mM Glyphosat hingegen sechs Isolate (NM:5, NM:36, NM:37, A17:32, A17:35, A17:41) identifiziert werden, welche mit Glyphosat als einziger Phosphatquelle einen Farbumschlag anzeigten (Tab. 8). Dabei wiesen alle entsprechenden Positivkontrollen einen Farbumschlag und alle Negativkontrollen keinen Farbumschlag auf. Ein weiteres Isolat (NM:50) zeigte bei beiden Glyphosatkonzentrationen in allen drei Medien einen Farbumschlag an. Allerdings fiel dieser in der Negativkontrolle deutlich geringer aus. Das geringe Wachstum in der Negativkontrolle könnte darauf hinweisen, dass das entsprechende Isolat auch bei sehr geringen Phosphatkonzentrationen wachsen konnte, wie dies beispielsweise für *Rhizobium*-Stämme beschrieben wurde (Cassman *et al.*, 1981). Wachstum bei beiden untersuchten Glyphosatkonzentrationen konnte für die Isolate NM:5 (*Paenibacillus*), NM:50 (*Burkholderia*), A17:32 (*Paenibacillus*) und A17:41 (*Rhizobium*) ermittelt werden.

Tab. 8: Ergebnisse des INT-Tests der Bodenisolat; 0,5 mM bzw. 1,5 mM: Glyphosatkonzentrationen; -: kein Farbumschlag; +: Farbumschlag mit Glyphosat als einziger P-Quelle

Isolat	A17		Isolat	NM	
	0,5 mM	1,5 mM		0,5 mM	1,5 mM
3	-	-	5	+	+
5	-	-	10	-	-
17	-	-	11	-	-
18	-	-	12	-	-
19	-	-	13	-	-
27	-	-	15	-	-
32	+	+	23	-	-
33	-	-	26	-	-
34	-	-	36	-	+
35	-	+	37	-	+
36	-	-	39	+	-
38	-	-	50	+	+
40	-	-	53	-	-
41	+	+			
46	-	-			

4.4 Glyphosatanalytik ausgewählter Isolate aus A17 und NM

Isolate, die im INT-Test positiv reagierten, wurden ausgewählt und auf ihre Fähigkeit Glyphosat abzubauen untersucht (siehe 3.4.10.1.3). Die Kontrollen *E. coli* und *Arthrobacter atrocyaneus* sollten in nur einem Medium angezogen werden. Deshalb wurde zunächst überprüft, ob die ausgewählten Isolate in dem für *E. coli* modifizierten MOPS-Medium (siehe 3.4.10.1.1) nach dem Zusatz von Phosphat wachsen konnten. Vier (A17:32, A17:35, NM:5, NM:50) der sieben im INT-Test positiven Isolate erfüllten diese Bedingung und wurden auf ihre Glyphosatabbaufähigkeit untersucht (Tab. 9).

Bei den Kontrollen konnte kein Rückgang der Glyphosatkonzentration im Versuchsverlauf festgestellt werden. Für *E. coli* ($\mu = 301 \mu\text{g Gly/l}$; $\sigma = 1$) und *Arthrobacter atrocyaneus* ($\mu = 293,33 \mu\text{g Gly/l}$; $\sigma = 15,28$) ergab die Untersuchung ähnliche Werte wie bei der Negativkontrolle ($\mu = 294,67 \mu\text{g Gly/l}$; $\sigma = 8,08$), die nur aus Medium bestand.

Eine Abnahme der Glyphosatkonzentration im Vergleich zur Negativkontrolle wurde hingegen bei allen untersuchten Isolaten ermittelt. Bei dem Isolat A17:32 ($\mu = 285,33 \mu\text{g Gly/l}$; $\sigma = 9,24$) mit phylogenetischer Ähnlichkeit zu *Paenibacillus* konnte eine Vermin-

derung der Glyphosatkonzentration im Vergleich zur Medienkontrolle um 9,34 µg/l, bei dem Isolat A17:35 ($\mu = 256,67$ µg Gly/l; $\sigma = 5,77$) mit phylogenetischer Ähnlichkeit zu *Rhodococcus* um 38 µg/l, bei dem Isolat NM:5 ($\mu = 255,33$ µg Gly/l; $\sigma = 4,74$) mit phylogenetischer Ähnlichkeit zu *Paenibacillus* um 38,34 µg/l und bei dem Isolat NM:50 ($\mu = 253,33$ µg Gly/l; $\sigma = 5,77$) mit phylogenetischer Ähnlichkeit zu *Burkholderia* um 41,34 µg/l ermittelt werden.

Tab. 9: Glyphosatkonzentration und Abnahme nach Inkubation ausgewählter Isolate und der Kontrollstämme

Isolat	Mittelwert (µg/l)	Standardabweichung (µg/l)	Abnahme (µg/l)	Abnahme (%)
Medium	294,7	8,1	-	-
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	293,3	15,3	1,4	0,5
<i>E. coli</i>	301,0	1,0	-	-
A17:32	285,3	9,2	9,3	3,2
A17:35	256,7	5,8	38,0	12,9
NM:5	255,3	4,7	38,3	13,0
NM:50	253,3	5,8	41,3	14,0

Die beiden Isolate, die eine phylogenetische Ähnlichkeit mit *Paenibacillus* (NM:5) und *Rhodococcus* (A17:35) aufwiesen, verringerten die Glyphosatkonzentration im Medium deutlich, wobei die Standardabweichungen gering waren. Sowohl im Wachstums- als auch im INT-Test waren beide Isolate positiv. Daraus konnte geschlossen werden, dass NM:5 und A17:35 zum Glyphosatabbau befähigt waren. Trotz der nicht so deutlichen Abnahme der Glyphosatkonzentration und der relativ hohen Standardabweichung des Isolats (A17:32), das eine phylogenetische Ähnlichkeit zu *Paenibacillus* hatte, deuteten die eindeutig positiven Ergebnisse des Wachstums- und des INT-Tests darauf hin, dass auch hier ein Glyphosatabbau stattgefunden hat. Obwohl das Isolat (NM:50) mit phylogenetischer Ähnlichkeit zu *Burkholderia* im INT-Test auch in der Negativkontrolle einen geringen Farbumschlag zeigte, wiesen die deutliche Verringerung der Glyphosatkonzentration mit einer geringen Standardabweichung und das positive Ergebnis im Wachstumstest auch hier darauf hin, dass NM:50 Glyphosat abbauen konnte.

4.5. Identifizierung von *phnJ*-Genfragmenten bei den isolierten Bakterien

4.5.1 Virtuelle PCR mit dem Primerpaar *phnJ1/phnJ2*

Zum Nachweis des im C-P-Lyaseoperon enthaltenen *phnJ*-Gens wurden die degenerierten

Primer *phnJ1/phnJ2* (siehe 3.4.2.2) konstruiert (Engel, persönliche Mitteilung). Die zur Primerkonstruktion verwendeten *phnJ*-Sequenzen sind in Abbildung 12 in einem phylogenetischen Stammbaum (siehe 3.4.11) dargestellt.

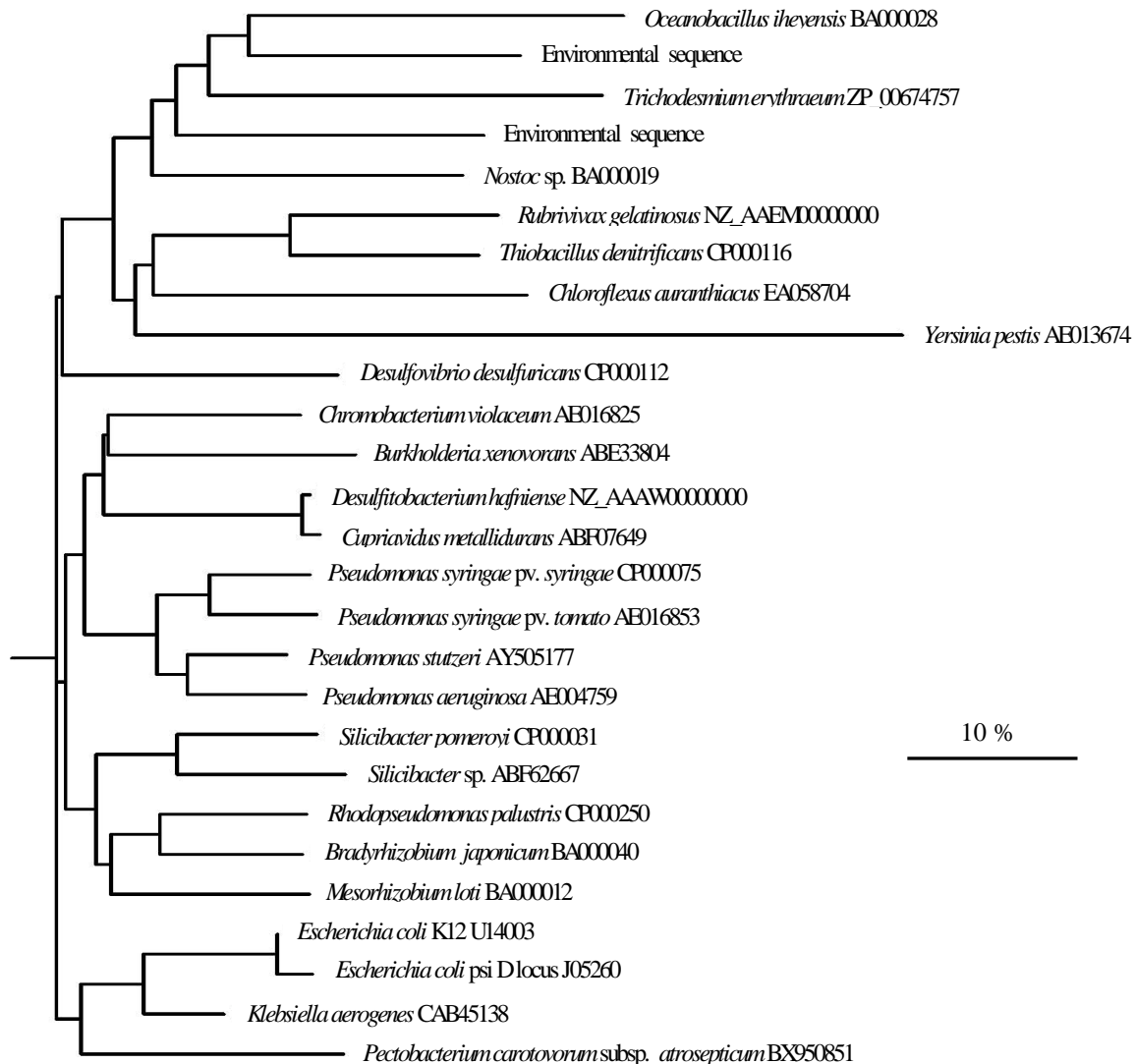


Abb. 12: Phylogenetischer Stammbaum der zur Primerkonstruktion verwendeten *phnJ*-Sequenzen. Rekonstruktion des Stammbaumes nach dem Neighbour Joining Verfahren

Die virtuelle PCR (siehe 3.4.11) ergab mit einer Fehlpaarung der Primer eine theoretische Fragmentlänge von 423 bp bzw. 426 bp innerhalb verschiedener Bakteriengruppen (Tab. 10). Dabei wurde immer das *phnJ*-Gen erfasst. Hauptsächlich *phnJ*-Gene von Proteobakterien wurden mit dem Primerpaar *phnJ1/phnJ2* erkannt. Mit zwei Fehlpaarungen der Primer *phnJ1* und *phnJ2* wurden auch unspezifische Zielsequenzen einer Größe von 54 bp bis 1930 bp amplifiziert.

Tab. 10: PCR-Fragmente nach der virtuellen PCR mit dem Primerpaar phnJ1/phnJ2

Anzahl an Fehlpaarungen der Primer phnJ1/phnJ2	Organismus	DNS-Region	Größe des PCR-Fragments
0	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AE007958)	<i>phnJ</i>	423 bp
0	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> (BA000028)	Phosphonatmetabolismus-protein	423 bp
0	<i>Thiobacillus denitrificans</i> (CP000116)	PhnJ	426 bp
1	<i>Chromobacterium violaceum</i> (AE016825)	<i>phnJ</i>	423 bp
1	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i> (BX950851)	<i>phnJ</i>	423 bp
1	<i>E. coli</i> K12 (U14003), <i>E. coli</i> K12 MG1655 (U00096), <i>E. coli</i> CFT073 (AE014075), <i>E. coli</i> W3110 (AP009048)	<i>phnJ</i>	423 bp
1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (AF061267)	htx-Operon; Phosphonatmetabolismusprotein; Ähnlichkeit zu PhnJ	426 bp
1	<i>Pseudomonas syringae</i> (CP000075)	PhnJ	423 bp
1	<i>Ralstonia eutropha</i> (CP000091)	PhnJ	423 bp
1	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009 (BX572595), <i>Rh. palustris</i> HaA2 (CP000250)	<i>phnJ</i>	423 bp
1	<i>Synechococcus</i> sp. (CP000240)	<i>phnJ</i>	423 bp
1	<i>Shigella boydii</i> (CP000036)	<i>phnJ</i>	423 bp

4.5.2 Detektion eines *phnJ*-Genfragmentens in *Oceanobacillus iheyensis*

Die Bedingungen der PCR mit dem neu konstruierten Primerpaar phnJ1/phnJ2 konnten erfolgreich optimiert werden (siehe 3.4.2.3). Für eine Amplifizierung mussten die Primerkonzentrationen und die MgCl₂-Konzentration optimiert werden und BSA und DMSO zugesetzt werden. Das *phnJ*-Genfragment der DNS der Positivkontrolle *Oceanobacillus iheyensis* konnte detektiert werden. Das gewünschte Fragment wies in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der virtuellen PCR eine erwartete Länge von ca. 420 bp auf (Abb. 13). *Oceanobacillus iheyensis* wurde als Positivkontrolle gewählt, da die Sequenz des *phnJ*-Gens zur Konstruktion der Primer phnJ1 und phnJ2 verwendet wurde.

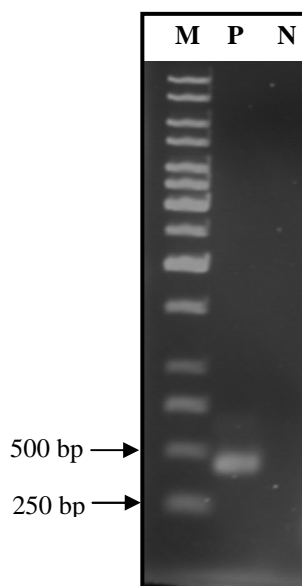


Abb. 13: Agarosegel des PCR-Produkts von *phnJ*, P: Positivkontrolle (*Oceanobacillus iheyensis*), N: Negativkontrolle, M: 1 kb DNS Marker

4.5.3 Screening der isolierten Bakterien nach *phnJ*-Genfragmenten

Die isolierten Bakterien wurden daraufhin untersucht, ob sie das *phnJ*-Gen enthielten. Bei den Isolaten A17:32 und NM:5 konnte erfolgreich ein PCR-Produkt der gewünschten Größe amplifiziert werden (Abb. 14). Das Isolat NM:5 (phylogenetische Ähnlichkeit mit *Paenibacillus alginolyticus*) wies neben dem PCR-Produkt der gewünschten Länge von ca. 420 bp ein zusätzliches etwas größeres Fragment auf. Die Sequenzierung dieses Fragments (siehe 3.4.11) ergab nach Umschreibung in eine Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeit mit bekannten Proteinen. Das sequenzierte Amplifikat NM:5 der erwarteten Größe hingegen hatte nach Übersetzung in eine Proteinsequenz eine Ähnlichkeit von 71 % zu einem Protein des Phosphonatmetabolismus von *Oceanobacillus iheyensis*. Auch das sequenzierte PCR-Produkt von A17:32 (phylogenetische Ähnlichkeit zu *Paenibacillus* sp.) zeigte, in eine Aminosäuresequenz umgeschrieben, eine Ähnlichkeit von 73 % zu einem Protein des Phosphonatmetabolismus von *Oceanobacillus iheyensis*. In Anbetracht der Ähnlichkeiten von 73 % (A17:32) und 71 % (NM:5) zu Proteinen des Phosphonatmetabolismus könnten gegebenenfalls neue Subklassen beschrieben worden sein.

Die vorangestellten Versuche ergaben, dass die beiden Isolate A17:32 und NM:5 (beide mit phylogenetischer Ähnlichkeit zu *Paenibacillus*) Glyphosat abbauen konnten. Der Nachweis des *phnJ*-Genfragments und somit des C-P-Lyaseoperons in diesen beiden Isolaten wies

darauf hin, dass der Abbau von Phosphonaten über den C-P-Lyaseweg erfolgte. Über welchen der beiden Abbauwege Glyphosat in diesen beiden Isolaten abgebaut wurde, bleibt offen, da in beiden Abbauwegen C-P-Lyasen beteiligt sind.

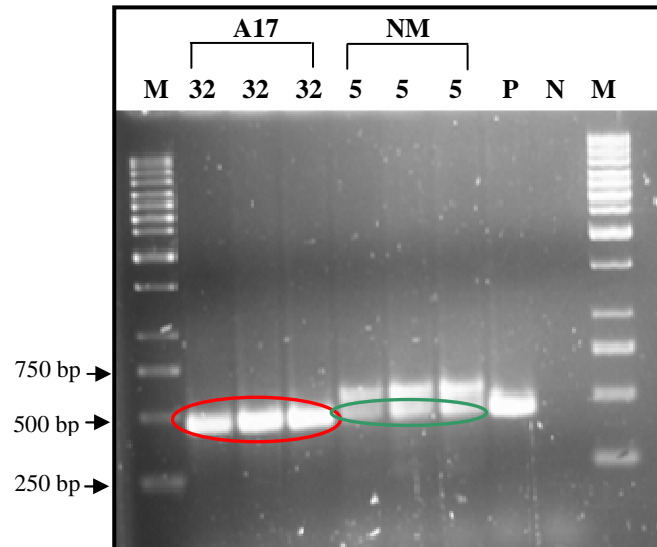
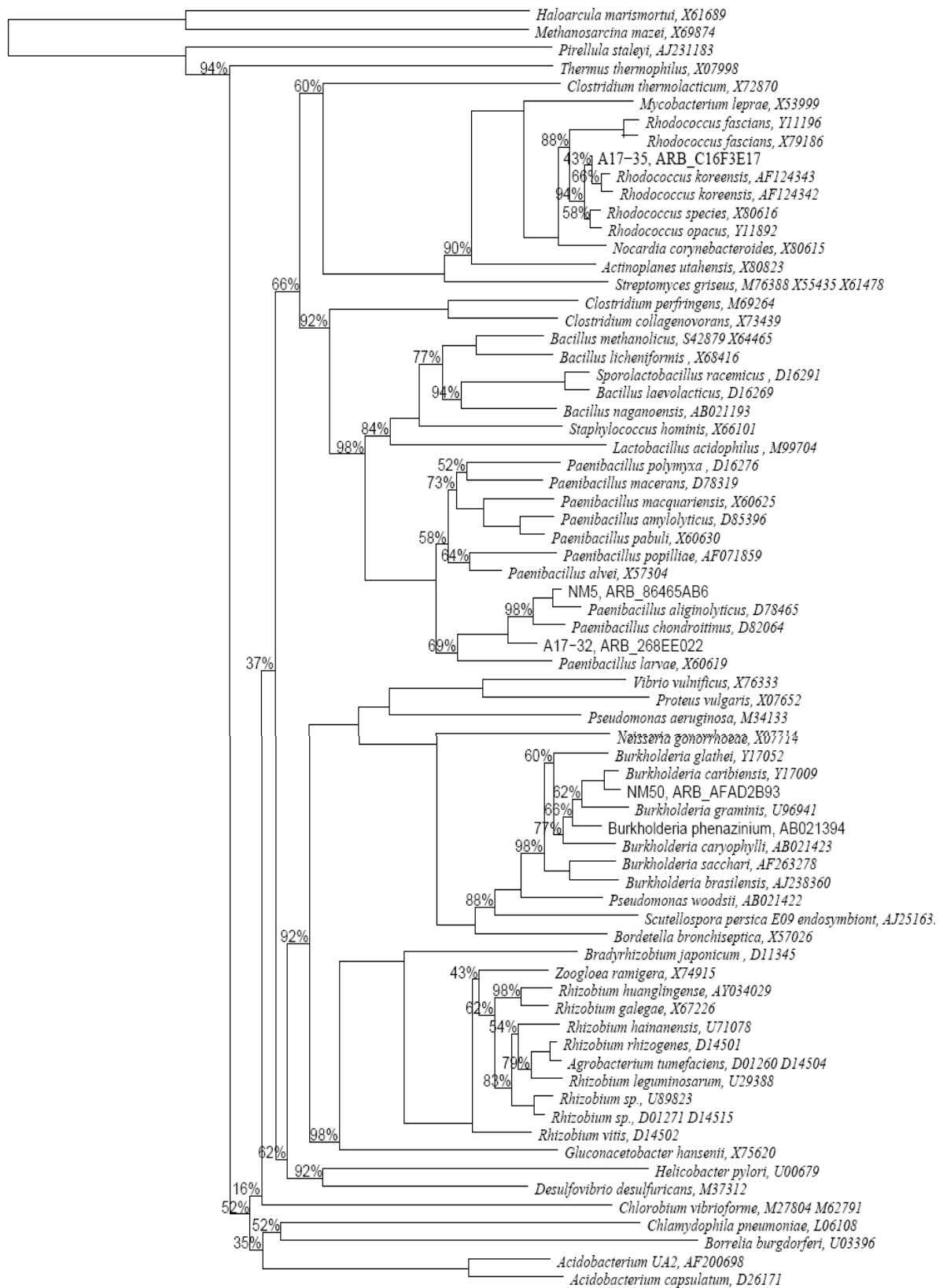


Abb. 14: Agarosegel der PCR-Produkte von *phnJ* der Bodenisolat, P: Positivkontrolle (*Oceanobacillus iheyensis*), N: Negativkontrolle, M: 1 kb DNS Marker

Bei dem Isolat A17:35 (phylogenetische Ähnlichkeit mit *Rhodococcus*) und dem Isolat NM:50 (phylogenetische Ähnlichkeit mit *Burkholderia*), die wie die vorherigen Versuche zeigten, ebenfalls zum Glyphosatabbau befähigt waren, konnte hingegen kein *phnJ*-Genfragment und folglich kein C-P-Lyaseoperon nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, dass diese beiden Isolate Glyphosat nicht über den C-P-Lyaseweg abbauten. Möglich wäre auch, dass die beiden Isolate ein C-P-Lyaseoperon enthielten, das von dem Primersystem *phnJ1/phnJ2* nicht erkannt wurde.

In Abbildung 15 ist die phylogenetische Verwandtschaft (siehe 3.4.11) der wichtigsten Isolate des kultivierungsabhängigen Ansatzes dargestellt. Diese Isolate, die zum Glyphosatabbau befähigt waren, konnten unterschiedlichen phylogenetischen Linien zugeordnet werden.



0.10

Abb. 15: Phylogenetischer Stammbaum der 16S-rRNS-Genfragmente der wichtigsten Isolate des kultivierungsabhängigen Ansatzes. *Paenibacillus* sp. (A17:32), *Rhodococcus* sp. (A17:35), *Paenibacillus alginolyticus* (NM:5), *Burkholderia hospita* (NM:50); mit Maximum Likelihood berechnet; Bootstrap mit 100 Wiederholungen;

4.6 Kultivierungsunabhängiger Ansatz: Erstellen und Charakterisierung einer Metagenombank

4.6.1 Erstellen einer Metagenombank

In einem kultivierungsunabhängigen Ansatz wurde eine Metagenombank erstellt (siehe 3.4.8). Dieser Ansatz sollte einen Zugang zu der genomischen Information eines möglichst großen Pools an Bodenmikroorganismen eröffnen, einschließlich solcher, die bisher nicht kultivierbar waren. Ziel dieses Ansatzes war es, in der Metagenombank Gene zu detektieren, die für den Abbau von Glyphosat kodierten. Die Vorgehensweise bei der Erstellung und der Durchsichtung der Metagenombank ist in Abbildung 16 wiedergegeben.

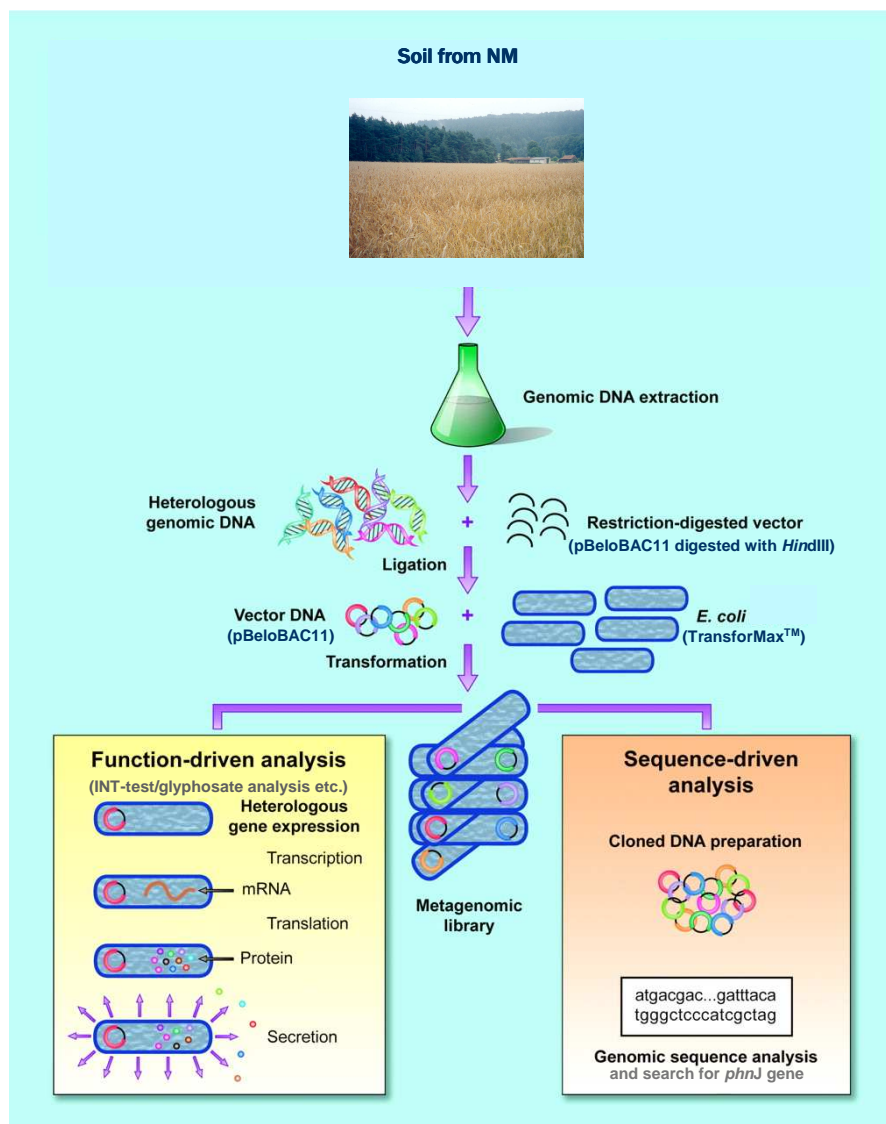


Abb. 16: Schematische Vorgehensweise bei der Erstellung und Durchsichtung der Metagenombank (modifiziert nach Handelsman (2004))

Zunächst wurde hochmolekulare DNS extrahiert (siehe 3.4.8.1). Hierbei wurde zur Extraktion sandiger Boden vom Standort NM aus dem Mikrokosmenexperiment verwendet. Durch den Zusatz von Glyphosat im Mikrokosmenexperiment wurden selektive Bedingungen zur Anreicherung glyphosatabbauender Mikroorganismen geschaffen. Dieser Schritt sollte den Anteil an DNS glyphosatabbauender Mikroorganismen in der Metagenombank erhöhen.

Durch Optimierung der Extraktionsbedingungen, in denen auf jegliche Vortexschritte verzichtet wurde und ausschließlich abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet wurden, konnte hochmolekulare DNS einer Größe von 50 – 150 kb erfolgreich isoliert werden. Lysozym wurde zugesetzt, um den Anteil an DNS grampositiver Bakterien zu erhöhen. Der Zusatz an Lysozym erhöhte die Gesamtmenge an extrahierter HMW-DNS erheblich (Abb. 17).

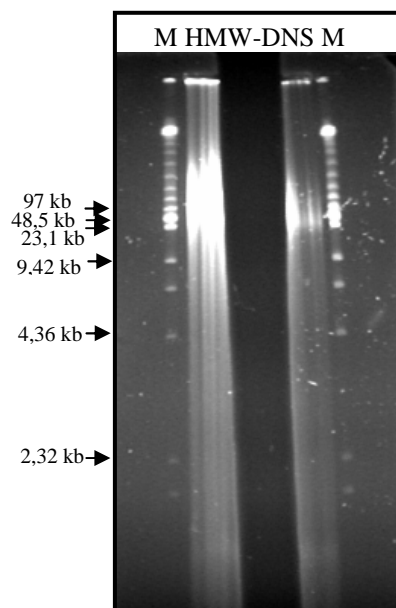


Abb. 17: Ränder eines Pulsfeldgels mit hochmolekularer DNS; schonendes Extraktionsverfahren + Lysozym; M: Low Range PFG Marker, HMW-DNS: hochmolekulare DNS

Durch Pulsfeldgelelektrophorese (siehe 3.4.7.2) konnten Huminstoffe von der gewonnenen HMW-DNS erfolgreich abgetrennt werden. Die nachfolgenden enzymatischen Reaktionen erfolgten unbeeinträchtigt von störenden Huminstoffen.

Die HMW-DNS aus dem Boden wurde anschließend partiell mit *Hind*III verdaut (siehe 3.4.8.2). Dieser Restriktionsschritt musste optimiert werden, um einerseits möglichst viele überhängende Enden und andererseits möglichst große DNS-Fragmente zu erhalten. Die Größe der aus dem Gel ausgeschnittenen und eluierten HMW-DNS (Abb. 18, Spur K) einer

Größe von 15 – 100 kb wurde auf diese Weise verringert. Die eingesetzte Menge an Restriktionsenzym und die Inkubationsdauer wurden so gewählt, dass der Großteil der geschnittenen HMW-DNS in einem Bereich von 15 - 40 kb lag (Abb.18, Spur 1).

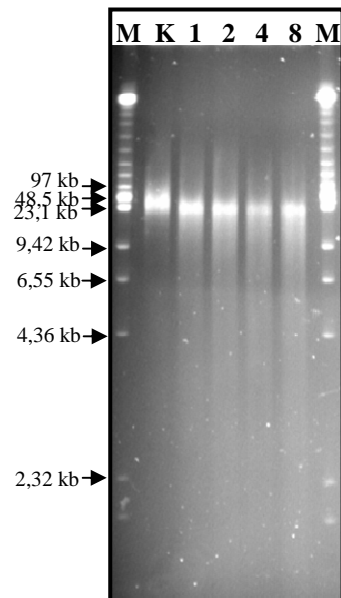


Abb. 18: Pulsfeldgel nach Restriktionsverdau gleicher Mengen HMW-DNS, M: Low Range PFG Marker, K: Kontrolle ohne *HindIII*, 1: 1 Unit *HindIII* + 10' Inkubationsdauer, 2: 2 Units *HindIII* + 10' Inkubationsdauer, 4: 4 Units *HindIII* + 10' Inkubationsdauer, 8: 8 Units *HindIII* + 60' Inkubationsdauer

Das single-copy-Plasmid pBeloBAC11 wurde in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt (siehe 3.4.8.3). Der geschnittene und dephosphorylierte Vektor (Abb. 19) wurde mit der geschnittenen aufgereinigten HMW-DNS ligiert und anschließend transformiert (siehe 3.4.8.4 – 3.4.8.7). Die Transformationseffizienz erreichte dabei Werte zwischen ca. $3,5 \cdot 10^6$ cfu/ μ g ligierter DNS und $4,0 \cdot 10^6$ cfu/ μ g ligierter DNS. Insgesamt wurden sieben Transformationen durchgeführt.

Die Metagenombank bestand letztendlich aus 5079 Klonen. Die Klone wurden in 53 Mikrotiterplatten mit jeweils 96-Vertiefungen aufbewahrt. Diese Anzahl wurde gewählt, um genügend genomische Information zum Auffinden der gesuchten Gene bereitzustellen und gleichzeitig eine handhabbare Größe zu besitzen.

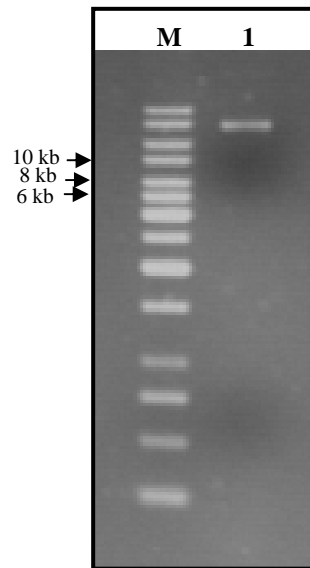


Abb. 19: Agarosegel des aufgereinigten und mit *Hind*III verdauten Vektors pBeloBAC11; M: 1 kb Marker; 1: pBeloBAC11

4.6.2 Charakterisierung der Metagenombank

4.6.2.1 Bestimmung der Insertgrößen der Metagenombank

Es wurden ca. 2 % (n = 110) der Klone der Metagenombank auf die Größe ihrer Inserts untersucht (siehe 3.4.9.1). Die entsprechenden Plasmide wurden mit *Hind*III verdaut. Dadurch wurde der Vektor pBeloBAC11 als 7,4 kb großes Fragment herausgeschnitten (Abb. 20). Durch Addition der übrigen Fragmentgrößen wurde die gesamte Insertgröße berechnet.

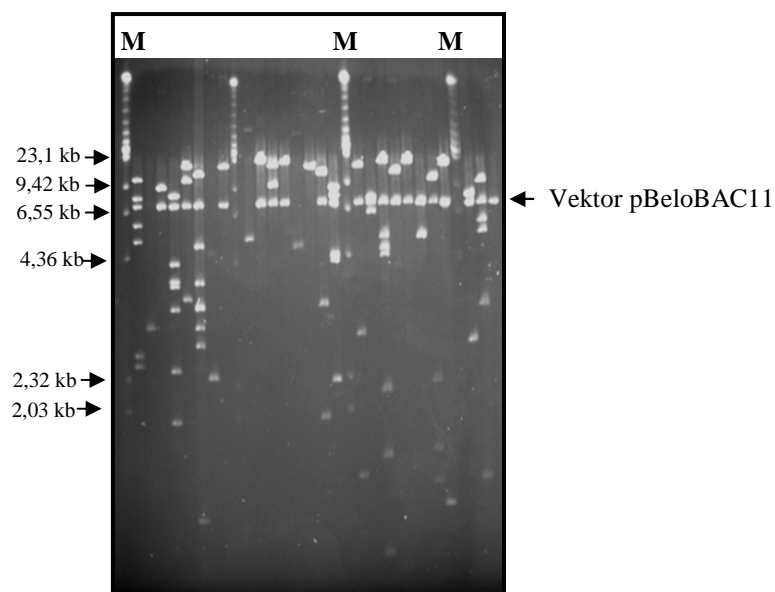


Abb. 20: Pulsfeldgel mit DNS-Fragmenten ausgewählter Klone der Metagenombank nach Restriktion mit *Hind*III, M: Low Range PFG Marker

Dadurch konnten folgende Aussagen über die Größenverteilung innerhalb der Inserts und die Gesamtmenge der klonierten DNS in der Metagenombank getroffen werden. 91,3 % der Klone enthielten ein Insert mit einer durchschnittlichen Größe von 18,6 kb. 9,06 % der Klone trugen ein Insert einer Größe von unter 10 kb, während 71 % der Klone ein Insert einer Größe von 10 – 30 kb integriert hatten. Bei 11 % der Klone der Metagenombank schließlich betrug die Größe der integrierten DNS-Fragmente 30 – 50 kb (Abb. 21). Diese Ergebnisse stimmten mit der ermittelten Größe von 15 – 40 kb (siehe 4.6.1) der HMW-DNS nach dem partiellen Verdau mit *HindIII* überein.

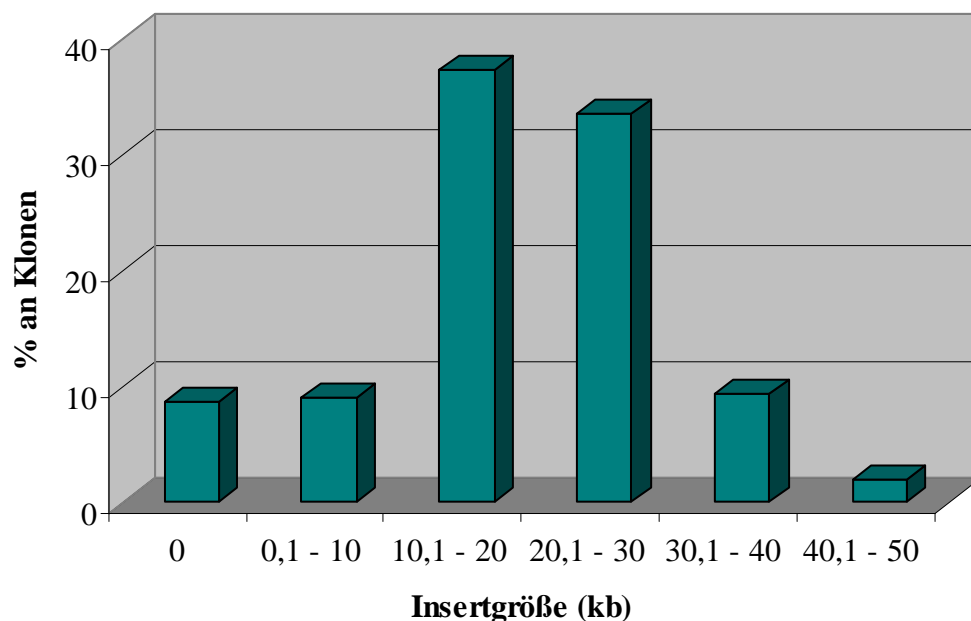


Abb. 21: Verteilung der Insertgrößen der Metagenombank (n = 110); Klone innerhalb eines Bereichs von 10 kb wurden gruppiert

Die ermittelte Größe der Inserts der erstellten Metagenombank war für den in dieser Arbeit verfolgten Zweck völlig ausreichend, da beispielsweise das C-P-Lyaseoperon von *E. coli* eine Größe von 10,9 kb aufwies (Metcalf und Wanner, 1993). Zusätzlich könnten sich auf dem Insert noch phylogenetische Marker oder weitere Gene befinden, die Aufschluss über die Physiologie und Ökologie des entsprechenden Mikroorganismus, von dem die Insert-DNS stammte, geben könnten.

Die Gesamtmenge der sich in der Metagenombank befindenden DNS bezifferte sich auf etwa 94,4 Mbp. Legte man eine durchschnittliche Größe von einer Kilobase pro Gen zugrunde, konnte angenommen werden, dass die Metagenombank etwa 94400 Gene enthielt.

4.6.2.2 Charakterisierung der Gene der Metagenombank

Um die in der Metagenombank enthaltenen Gene zu charakterisieren, wurden Sequenzen von einem der Insertionsenden von 114 zufällig ausgewählten Klonen der Metagenombank generiert (siehe 3.4.9.2). Neun (7,9 %) dieser Sequenzen enthielten kein Insert. Unter den verbleibenden 105 Sequenzen wiesen 97 (92,4 %) mit einer Länge von über 770 bp eine hohe Qualität auf. Insgesamt wurden 79,8 kb in diesem Ansatz analysiert. Abzüglich der Vektorsequenz wurden 74,7 kb in diesem Endsequenzierungsansatz untersucht.

4.6.2.2.1 Bestimmung des G + C-Gehalts

Der nach dem Entfernen der Vektorsequenz bestimmte G + C-Gehalt (siehe 3.4.9.2) der 105 Sequenzen zeigte eine starke Variation (Abb. 22). Dabei dominierten Sequenzen mit einem relativ hohen G + C-Gehalt. 75,3 % der untersuchten Sequenzen wiesen einen G + C-Anteil von über 55,1 % auf. Ein Maximum (28,6 %) der Sequenzen wurde bei 60,1 – 65 % G + C-Gehalt erreicht. Wie erwartet, hat der Zusatz von Lysozym in der Zellyse die Zusammensetzung der in der Metagenombank repräsentierten mikrobiellen Genome beeinflusst. Es ist gelungen, Mikroorganismen anzureichern, die sensitiv gegenüber der Zellwandlyse mit Lysozym waren.

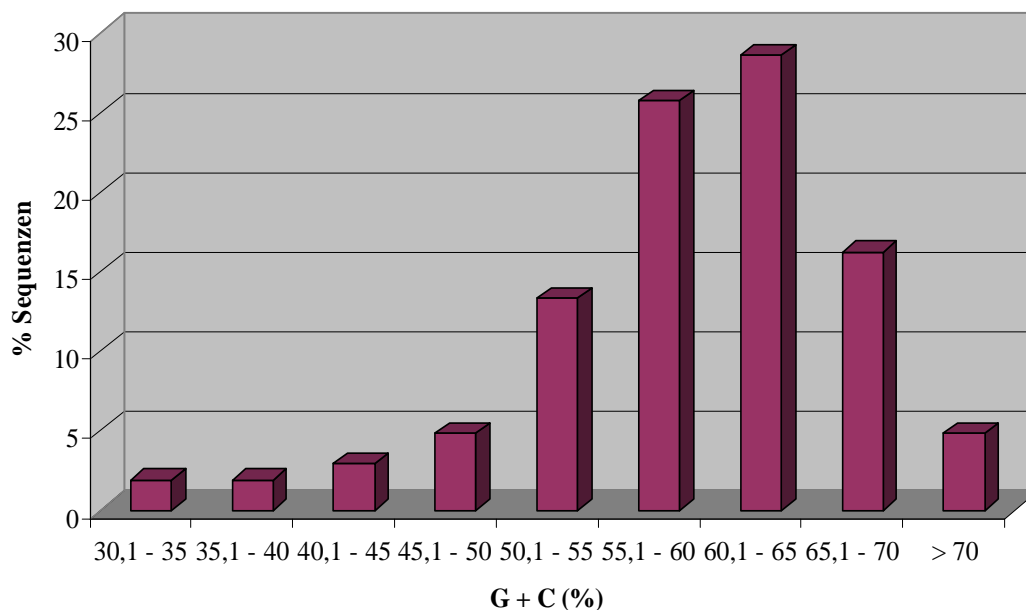


Abb. 22: Verteilung der Sequenzen im Endsequenzierungsansatz der Metagenombank auf Basis ihrer G + C-Verhältnisse

4.6.2.2.2 BlastX Ergebnisse

62 (59,0 %) Sequenzen zeigten signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten proteinkodierenden Genen der Datenbank (siehe 3.4.9.2 und 3.4.11), basierend auf BlastX-Ergebnissen mit e-Werten $< e^{-15}$. 60 (57,1 %) dieser Sequenzen ergaben eine höchste Übereinstimmung mit bakteriellen Proteinen. Dabei konnten 46,7 % dieser Sequenzen Proteinen von gramnegativen Bakterien, 4,8 % Proteinen von grampositiven Bakterien und 5,7 % sonstigen bakteriellen Proteinen zugeordnet werden, während jeweils eine Sequenz die beste Übereinstimmung mit einem pilzlichen (1,0 %) und einem anderen eukaryotischen (1,0 %) Protein aufwies (Abb. 23).

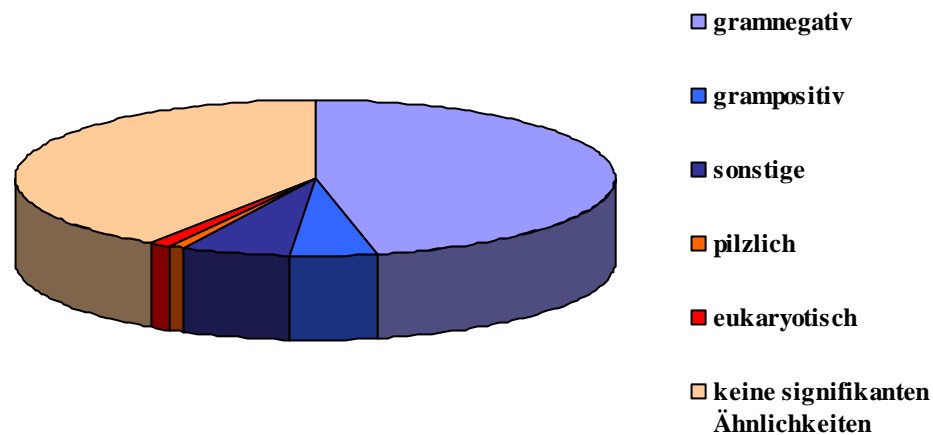


Abb. 23: Zuordnung der Sequenzen mit signifikanten Ähnlichkeiten (e-Werten $< e^{-15}$) zu ihrem phylogenetischen Ursprung

Von den 105 untersuchten Sequenzen waren 19 (18,1 %) unbekannt. Proteinen mit einer hypothetischen Funktion wurden 37 (35,2 %) Sequenzen und Proteinen unbekannter Funktion wurden drei Sequenzen (2,9 %) zugeordnet. 19 (18,1 %) Sequenzen hatten eine Ähnlichkeit von unter 50 % zu bekannten Proteinen. Den verbleibenden 27 (25,7 %) Sequenzen konnten signifikante Ähnlichkeiten von über 50 % zu bekannten proteinkodierenden Genen in der Datenbank zugewiesen werden (Tab. 11).

Tab. 11: Identifizierung potenzieller bakterieller unbekannter Genomfragmente der Metagenombank; Auswahl an Klonen: Ähnlichkeit > 50 % und e-Werte < e⁻¹⁵

Klon	Name des Proteins	Organismus	Ähnlichkeit (AS)
1A-C7	Transposase	<i>Acidobacteria bacterium</i>	59/111 (53 %)
1A-G9	Glutamyl-, Glutaminyl-tRNS-Synthetase	<i>Novospingobium aromaticivorans</i>	162/239 (67 %)
2A-A2	zyklisches Nukleotid-Bindeprotein	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	114/210 (54 %)
2A-B6	N-Acyltyrosinsynthase	nicht kultiviertes Bakterium	57/106 (53 %)
3A-B5	Glucosamin-Fructose-6-phosphat Aminotransferase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	174/231 (75 %)
3A-F3	4 Fe-4 S Ferredoxin	<i>Acidobacteria bacterium</i>	134/231 (58 %)
3A-H1	Phenylacetyl-CoA-Ligase	<i>Burkholderia xenovorans</i>	170/241 (70 %)
4A-C3	6-Phosphogluconatdehydrogenase	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	156/187 (83 %)
4A-D5	Kationen-/Multidrug-effluxpumpe	<i>Nostoc punctiforme</i>	127/212 (59 %)
4A-F10	Penicillinbindeprotein	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	72/137 (52 %)
5A-E9	Polyphosphatkinase	<i>Synechococcus</i> sp.	145/246 (58 %)
6A-E12	Acetyl-CoA-Synthetase	<i>Erythrobacter litoralis</i>	119/154 (77 %)
6A-H7	Insertionselement IS 150	<i>Escherichia coli</i>	177/177 (100 %)
14A-G5	ATPase	<i>Chlorobium phaenobacteroides</i>	152/238 (63 %)
15A-A10	4-Alpha-L-Fucosyltransferase	<i>E. coli</i>	124/124 (100 %)
15A-C3	Aconitathydratase 1	<i>Burkholderia ambifera</i>	206/264 (78 %)
19A-A4	GTPase-Translationselongationsfaktor	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	203/242 (83 %)
19A-G7	ABC-Transporter	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	171/185 (92 %)
22A-H3	Methionyl-tRNS-Synthetase	<i>Flavobacterium</i> sp.	46/65 (70 %)
23A-A2	Nitrilase	<i>Novospingobium aromaticivorans</i>	156/207 (75 %)
23A-D4	ABC-Transporter	<i>Mesorhizobium loti</i>	207/245 (84 %)
23A-E8	Benzoat-CoA-Ligase	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	174/228 (76 %)
24A-G3	Glucosamin-Fructose-6-phosphat Aminotransferase	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	161/254 (63 %)
25A-E7	RtsD	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	132/247 (53 %)
27A-A3	IspG Protein	<i>Solibacter usitatus</i>	151/208 (72 %)
53A-D2	ORF_f746	<i>E. coli</i>	160/160 (100 %)
53A-G3	Translationsinitiationsfaktor 3	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	114/161 (70 %)

Unter den aufgeführten Aminosäuresequenzen befanden sich Proteine, die eine wichtige Rolle in der bakteriellen Proteinbiosynthese spielten (z. B. Translationsinitiationsfaktor 3, GTPase-Translationselongationsfaktor, tRNS-Synthetasen). Auch waren Proteine des Energiestoffwechsels (z. B. ATPase) und für Stoffwechselwege bzw. Synthesewege charakteristische Proteine enthalten (z. B. 6-Phosphogluconatdehydrogenase, Acetyl-CoA-Synthetase). Neben Membranproteinen (z. B. ABC-Transporter, Penicillinbindeprotein) wurden ein Regulationsprotein (zyklisches Nukleotid-Bindeprotein), ein Insertionselement (IS 150) und eine Transposase gefunden. Das vielfältige Spektrum an Proteinen ließ den Schluss zu, dass in der gesamten Metagenombank genetische Informationen, die für eine Vielzahl unterschiedlicher funktioneller Proteine kodierten, enthalten waren.

Tabelle 12 fasst wichtige Ergebnisse des Endsequenzierungsansatzes zusammen.

Tab. 12: Statistische Auswertung des Endsequenzierungsansatzes der Metagenombank

Endsequenzierungsansatz	Anzahl/ kb
Anzahl an sequenzierten Klonen	114
Anzahl an sequenzierten Klonen mit Insert	105
Gesamtmenge an sequenzierten DNS-Sequenzen	79,8 kb
sequenzierte DNS-Sequenzen ohne Vektorsequenzen	74,7 kb
Sequenzen > 770 bp	97
Klone mit unbekanntem Sequenzen	19
Klone mit unbekannter Funktion	3
Klone mit hypothetischer Funktion	37
Klone mit Funktion, Ähnlichkeit < 50 %	19
Klone mit Funktion, Ähnlichkeit > 50 %	27
Sequenzen mit Ähnlichkeiten < e ⁻¹⁵	62
höchste Ähnlichkeit mit bakteriellen Proteinen	60
höchste Ähnlichkeit mit pilzlichen Proteinen	1
höchste Ähnlichkeit mit eukaryotischen Proteinen	1

4.6.2.2.3 COG-Kategorisierung

Um Aussagen über den kodierenden Anteil und die Diversität der Metagenombank treffen zu können, wurden die 105 Sequenzen des Endsequenzierungsansatzes COG-Kategorien zugeordnet (siehe 3.4.9.2). Jede COG-Kategorie (cluster of orthologous groups, NCBI) beinhaltete Proteine, die eine gemeinsame Funktion oder Domäne hatten. Diese hatten ihrerseits eine bestimmte Rolle in zellulären Prozessen. Alle COG-Kategorien wurden in Großbuchstaben angegeben und konnten vier übergeordneten funktionellen Gruppen zugeordnet werden (Informationsspeicherung und Prozessierung, zelluläre Prozesse und Signalübertragung, Metabolismus, schlecht charakterisierte Funktionen). Tabelle 13 fasst die Ergebnisse der COG-Kategorisierung zusammen. Zum Vergleich wurde die Zuordnungen zu COG-Kategorien der Genome von drei kultivierten Mikroorganismen angegeben (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/>). Dabei handelte es sich einerseits um zwei heterotrophe Bakterien, das α -Proteobakterium *Mesorhizobium loti* und das grampositive Bakterium *Bacillus subtilis*, die typischerweise im Boden und der Rhizosphäre zu finden sind. Andererseits wurde das autotrophe hyperthermophile Archaeon *Methanocaldococcus janaschii* aufgelistet.

28,6 % der Sequenzen konnten keiner COG-Kategorie zugeordnet werden. Dies kann darauf beruhen, dass die zu untersuchende Proteinsequenz nicht zu einer bisher definierten COG-Kategorie gehörte. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen könnten aber auch intergenische Regionen oder Fragmente von Genen beinhalten. 12,4 % der Sequenzen hingegen wurden mehreren COG-Kategorien zugewiesen. Dies kann daran liegen, dass die entsprechende Proteinsequenz multifunktional war oder aus mehreren Domänen bestand, die durch verschiedene COG-Kategorien repräsentiert wurden. 59 % der Sequenzen konnten eindeutig einer COG-Kategorie zugeordnet werden.

Tab. 13: Zuordnung der Sequenzen des Endsequenzierungsansatzes zu COG-Kategorien

Metagenombank: Endsequenzierungs- ansatz	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Kategorie	Bedeutung der COG
74,7 kb	7,04 Mb ^a	4,22 Mb ^b	1,67 Mb ^c	kb/Mb	sequenzierte DNS/ Genomgröße
105	7429	4495	1836	n	Sequenzen/ ORFs*
28,60	29,12	31,70	27,51	%	nicht in COG
12,40				%	Zuordnung zu mehreren COG-Kategorien
59,00	70,88	68,30	72,49	%	eindeutig in einer COG-Kategorie
<u>Informationsspeicherung und Prozessierung</u>					
4,76	2,17	3,00	6,86	J	Translation, ribosomale Strukturierung und Biogenese
0	0	0	0,05	A	RNS-Prozessierung und Modifikation
0	6,66	6,34	3,38	K	Transkription
1,90	3,23	3,03	4,96	L	DNS-Replikation, Rekombination und Reparatur
0	0	0	0,27	B	Chromatinstruktur und Dynamik
<u>Zelluläre Prozesse und Signalübertragung</u>					
0,95	0,39	0,71	1,20	D	Zellzykluskontrolle, Zellteilung und Chromatinaufteilung
0	0	0	0	Y	Zellkernstruktur
0	0,81	1,16	0,76	V	Verteidigungsmechanismen
6,67	2,54	3,47	0,60	T	Signaltransduktionsmechanismen
3,81	3,84	4,23	1,96	M	Biogenese von Zellwand-, -membran und -hülle
2,86	0,65	1,22	0,87	N	Beweglichkeit und Sekretion
0	0	0	0	Z	Zytoskelett
0	0,01	0	0	W	extrazelluläre Strukturen
0	1,21	0,93	1,31	U	intrazellulärer Transport und Sekretion
1,90	2,34	2,16	2,34	O	Posttranslationale Modifikation, Protein-Turnover, Chaperone
<u>Metabolismus</u>					
4,76	4,04	3,98	6,75	C	Energieproduktion und Konversion
0,95	6,04	4,58	2,40	G	Kohlehydrattransport und Metabolismus
2,86	8,67	6,52	5,28	E	Aminosäuretransport und Metabolismus
0	1,09	1,67	2,40	F	Nukleotidtransport und Metabolismus
0,95	2,30	2,54	4,52	H	Coenzymtransport und Metabolismus
1,90	3,61	2,54	0,87	I	Lipidtransport und Metabolismus
6,67	3,19	3,80	3,49	P	anorganischer Ionentransport und Metabolismus
0,95	2,75	2,22	0,27	Q	Sekundärmetabolitbiosynthese, Transport, Katabolismus
<u>schlecht charakterisierte Proteine</u>					
12,38	9,54	8,65	12,91	R	generelle nur vermutete Funktion
4,76	5,80	5,54	9,04	S	unbekannte Funktion

a: Kaneko *et al.*, 2000; b: Kunst *et al.*, 1997; c: Bult *et al.*, 1996;; *: Sequenzen des Endsequenzierungsansatzes; ORFs: potenzielle Gene in den Genomen der Referenzorganismen (*Mesorhizobium loti*, *B. subtilis*, *Methanocaldococcus jannaschii*)

Die Genomgrößen der Referenzorganismen waren um das 23- bis 95-fache größer als die Gesamtmenge der im Endsequenzierungsansatz untersuchten Sequenzen. Dennoch stimmte der Großteil der Zuordnung zu den COG-Kategorien der Sequenzen des Endsequenzierungsansatzes mit der der Referenzorganismen überein. Die in der Metagenombank enthaltenen Sequenzen repräsentierten in etwa einen Durchschnittswert an Genomen, die in diesem Habitat vorhanden waren. Abweichungen von über 1,6 % zu dem ähnlichsten Prozentsatz der Referenzorganismen ergaben sich in den Kategorien T (Signaltransduktionsmechanismen), E (Aminosäuretransport und Metabolismus) und P (anorganischer Ionentransport und Metabolismus). Während den Kategorien T und P im Endsequenzierungsansatz ein größerer Anteil an Sequenzen im Vergleich zu den Referenzorganismen zugeordnet werden konnte, wurde der Kategorie E ein geringerer Anteil zugewiesen.

4.6.2.3 Phylogenetische Charakterisierung der Metagenombank

Einige Sequenzen, die relevante phylogenetische Funktionen enthielten, wurden im Endsequenzierungsansatz identifiziert (siehe 3.4.9.2). Unter ihnen befanden sich zwei t-RNS-Synthetasen und zwei Translationelongationsfaktoren (Tab. 11). Um Aussagen über den phylogenetischen Ursprung der Sequenzen der Metagenombank treffen zu können, wurden die Sequenzen des Endsequenzierungsansatzes nach partiellen ribosomalen RNS-Operonen durchsucht. Eine partielle Sequenz eines 23S-rRNS-Genes wurde dabei gefunden (3A:E4). Diese Sequenz konnte einem bislang nicht kultivierbaren Mikroorganismus zugeordnet werden. Der nächste Verwandte, der sich zuordnen ließ, hatte eine phylogenetische Ähnlichkeit (96 %) zu *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

4.6.3 Screening der Metagenombank

4.6.3.1 Funktionelles Screening der Metagenombank

Die 5079 Klone der Metagenombank wurden daraufhin untersucht, ob sie mit Glyphosat als einziger Phosphatquelle wachsen konnten. Dadurch könnten auch bisher unbekannte Gene gefunden werden, die für den Abbau von Glyphosat kodierten. *E. coli* musste hierfür nicht genetisch modifiziert werden, da *E. coli* Glyphosat nicht abbauen konnte. Es gelang, das flüssige MOPS-Medium, das für die Isolate verwendet wurde, so zu optimieren, dass auch *E. coli* nach dem Zusatz von Phosphat in diesem Medium wachsen konnte (siehe 3.4.10.1.1).

Bei 265 Klonen (siehe Anhang 5) war innerhalb der Inkubationszeit von acht Tagen in

MOPS-Medium mit Glyphosat als einziger Phosphatquelle ein schwaches Wachstum zu erkennen. Keiner dieser Klone wies ein ebenso starkes Wachstum wie im Kontrollmedium, das neben Glyphosat K_2HPO_4 enthielt, auf.

Um positive Klone einfacher anhand ihres Farbumschlags zu erkennen, wurden die 265 potenziell positiven Klone einem INT-Test unterzogen (siehe 3.4.10.1.2). Gleichzeitig wurde die Inkubationstemperatur vor dem Zusatz von INT auf Raumtemperatur reduziert. Da Bodenmikroorganismen als DNS-Donoren für die Metagenombank dienten, sollte dies bewirken, dass Enzymaktivitäten in ihrem Temperaturoptimum stattfanden. Es konnten reproduzierbar acht Klone (11A:C3; 11A:D7; 17A:C5; 19A:B10; 30A:B11; 31A:D6; 33A:C4; 53A:A5) ermittelt werden, die in dem Medium mit Glyphosat als einziger P-Quelle einen sehr schwachen Farbumschlag anzeigten (Tab. 14). Da dies als Kriterium für den Abbau von Glyphosat nicht ausreichend war, wurden diese Klone weiteren Versuchen unterzogen.

Tab. 14: Ergebnisse im Wachstums- und INT-Test ausgewählter Klone der Metagenombank; +: schwaches Wachstum; (+): sehr schwacher Farbumschlag

Isolat	Wachstums- test	INT-Test
11A-C3	+	(+)
11A-D7	+	(+)
17A-C5	+	(+)
19A-B10	+	(+)
30A-B11	+	(+)
31A-D6	+	(+)
33A-C4	+	(+)
53A-A5	+	(+)

4.6.3.2 Screening der potenziell positiven Klone auf DNS-Ebene

Probleme bei der heterologen Genexpression oder beim Ausschleusen der gewünschten Proteine aus *E. coli* könnten der Grund dafür sein, dass im funktionellen Screening kein eindeutig positiver Klon gefunden werden konnte. Um diese Probleme zu umgehen, wurden die 265 potenziell positiven Klone der Metagenombank auf DNS-Ebene daraufhin untersucht, ob sie ein *phnJ*-Genfragment und somit ein C-P-Lyaseoperon enthielten (siehe 3.4.10.2). Hierzu wurden pro PCR-Ansatz je zehn rekombinante Plasmide vereinigt. Mit dem Primerpaar *phnJ1/phnJ2* wurde in einem dieser Ansätze (Ansatz 14) ein PCR-Produkt der

erwarteten Größe von ca. 420 bp identifiziert (Abb. 24).

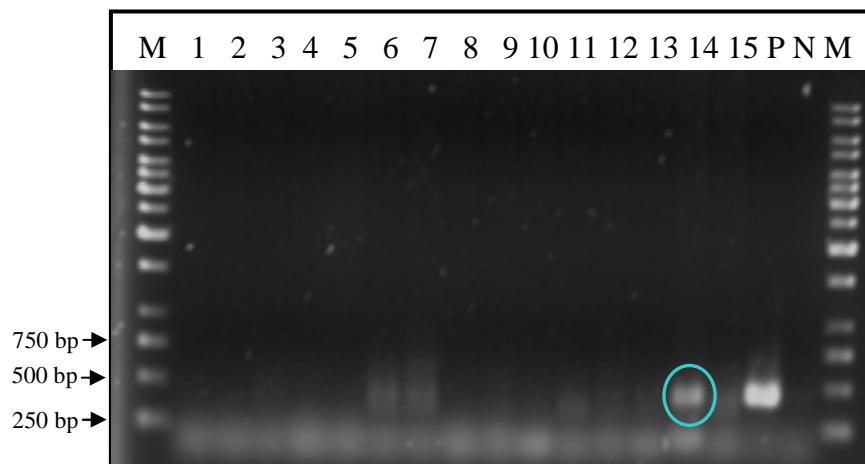


Abb. 24: Agarosegel der PCR-Produkte mit dem Primerpaar phnJ1/phnJ2; 1 – 15: jeweils zehn rekombinante Plasmide (potenziell positive Klone der Metagenombank) in einem PCR-Ansatz vereinigt, M: 1 kb DNS Marker, P: Positivkontrolle (*Oceanobacillus iheyensis*), N: Negativkontrolle

Die zehn rekombinanten Plasmide des Ansatzes 14 wurden einzeln in der PCR daraufhin untersucht, welcher Klon das entsprechende Amplifikat lieferte (Abb. 25). Das PCR-Produkt der erwarteten Größe von ca. 420 bp lieferte Klon 26A:F8 (14 B).

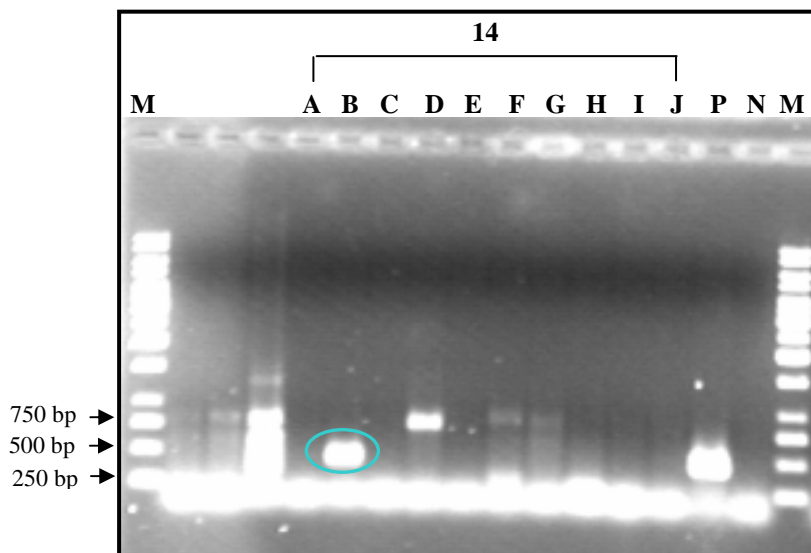


Abb. 25: Agarosegel der PCR-Produkte mit dem Primerpaar phnJ1/phnJ2; vereinzelte Klone (potenziell positive Klone der Metagenombank) des Ansatzes 14 (A – J); M: 1 kb DNS Marker, P: Positivkontrolle (*Oceanobacillus iheyensis*); N: Negativkontrolle

In den phylogenetischen Stammbaum (siehe 3.4.11) der PhnJ-Sequenzen (Abb. 26) wurden auch die PhnJ-Sequenzen der Isolate mit phylogenetischer Ähnlichkeit zu *Paenibacillus* sp. (A17:32) und *Paenibacillus alginolyticus* (NM:5) und die Aminosäuresequenz des Amplifikats von Klon 26A:F8 der Metagenombank eingerechnet. Aus dem phylogenetischen Stamm-

baum konnte geschlossen werden, dass die umgerechnete Aminosäuresequenz des Amplifikats von 26A:F8 mit keiner der bisher bekannten PhnJ-Sequenzen verwandt war.

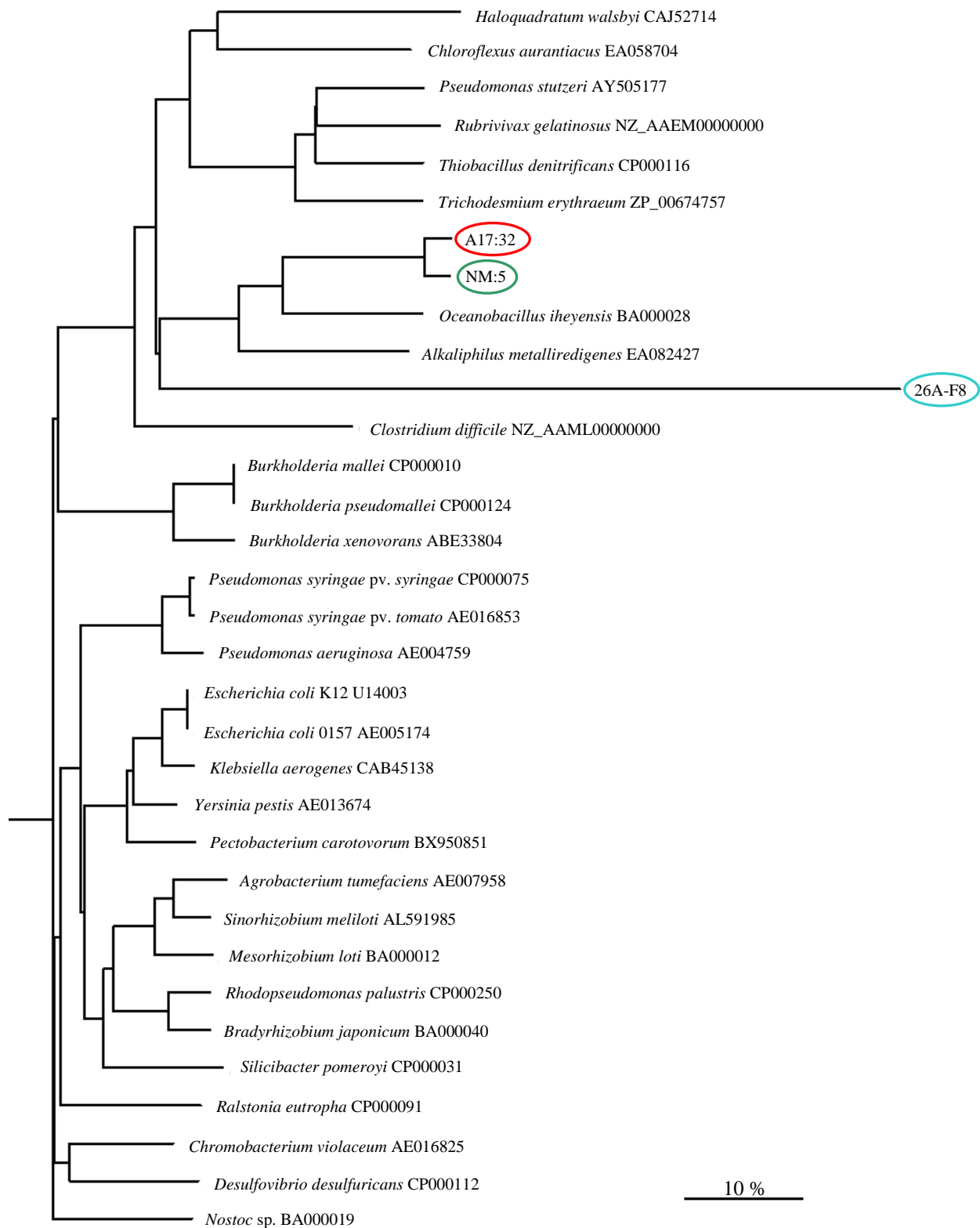


Abb. 26: Phylogenetischer Stammbaum bekannter PhnJ-Aminosäuresequenzen, PhnJ-Aminosäuresequenzen der Isolate A17:32 und NM:5 und der Aminosäuresequenz des Amplifikats von Klon 26A:F8 der Metagenombank; Rekonstruktion des Stammbaumes nach dem Neighbour Joining Verfahren

4.6.3.3 Untersuchung ausgewählter Klone auf Glyphosatabbaufähigkeit

Ausgewählte Klone der Metagenombank wurden auf ihre Fähigkeit Glyphosat abzubauen untersucht (siehe 3.4.10.1.3). Als Auswahlkriterium dienten die Voruntersuchungen. Die Klone, die sowohl im Wachstumstest als auch im INT-Test schwach positiv waren (11A:C3, 11A:D7, 17A:C5, 19A:B10, 30A:B11, 31A:D6, 33A:C4, 53A:A5), wurden ausgewählt. Außerdem wurde der Klon 26A:F8 selektiert. Dieser Klon war im Wachstumstest schwach positiv, im INT-Test negativ, lieferte aber mit dem Primerpaar phnJ1/phnJ2 ein PCR-Produkt der erwarteten Größe. Als Negativkontrollen dienten nicht-inokuliertes Medium und mit *E. coli* angeimpftes Medium. Als potenzielle Positivkontrolle wurde *Arthrobacter atrocyaneus* in entsprechendem MOPS-Medium inokuliert (Tab. 15).

Tab. 15: Glyphosatkonzentration und Abnahme nach Inkubation ausgewählter Klone der Metagenombank

Isolat/Klon (Metagenombank)	Mittelwert ($\mu\text{g/l}$)	Standardab- weichung ($\mu\text{g/l}$)	Abnahme ($\mu\text{g/l}$)	Abnahme (%)
Medium	291,33	12,06	-	-
<i>Escherichia coli</i>	301	1	-	-
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	293,33	15,28	-	-
11A:C3	316,67	15,28	-	-
11A:D7	296,67	20,82	-	-
17A:C5	263,33	5,77	28	9,6
19A:B10	303,33	5,77	-	-
26A:F8	316,67	5,77	-	-
30A:B11	323,33	5,77	-	-
31A:D6	330	0	-	-
33A:C4	363,33	30,55	-	-
53A:A5	306,67	11,55	-	-

Bei den Kontrollen wurde keine Abnahme der Glyphosatkonzentration im Versuchsverlauf ermittelt. Für *E. coli* ($\mu = 301 \mu\text{g Gly/l}$; $\sigma = 1$) und *Arthrobacter atrocyaneus* ($\mu = 293,33 \mu\text{g Gly/l}$; $\sigma = 15,28$) ergab die Untersuchung ähnliche Werte wie bei der Negativkontrolle ($\mu = 291,33 \mu\text{g Gly/l}$; $\sigma = 12,06$), die nur aus Medium bestand. Die für *Arthrobacter atrocyaneus* bereits beschriebene Glyphosatabbaufähigkeit (Pipke und Amrhein, 1988), konnte unter den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen nicht bestätigt werden.

Klon 26A:F8 konnte die Glyphosatkonzentration im Vergleich zur Negativkontrolle nicht vermindern ($\mu = 316,67$; $\sigma = 5,77$). Dieser Klon konnte somit Glyphosat nicht abbauen.

Als einziger der untersuchten Klone verringerte 17A:C5 die Glyphosatkonzentration im Vergleich zur Negativkontrolle, die nur aus Medium bestand, um ca. 28 $\mu\text{g/l}$ ($\mu = 263,33$; $\sigma = 5,77$). Hierbei handelte es sich um eine deutliche Abnahme, wobei die Standardabweichung gering war. In Verbindung mit den schwach positiven Ergebnissen im Wachstums- und im INT-Test gab diese Abnahme der Glyphosatkonzentration einen Hinweis auf die Befähigung von Klon 17A:C5 zum Abbau von Glyphosat. Da in der PCR kein *phnJ*-Genfragment bei dem Klon 17A:C5 nachgewiesen wurde, deutete dies darauf hin, dass der Abbau von Phosphonaten hierbei nicht über den C-P-Lyaseweg erfolgte. Glyphosat wurde in diesem Isolat entweder über einen bisher unbekanntem Weg abgebaut, oder es war ein *phnJ*-Gen vorhanden, das aber mit dem Primersystem *phnJ1/phnJ2* nicht erkannt wurde.

4.7 Nachweis von *phnJ*-Genfragmenten im Boden

4.7.1 Virtuelle PCR mit dem Primerpaar *phnJoc1/phnJoc2*

Zum Nachweis des im C-P-Lyaseoperon enthaltenen *phnJ*-Gens im Boden wurden neue Primer konstruiert (Engel, persönliche Mitteilung). Bei der Konstruktion der degenerierten Primer *phnJoc1/phnJoc2* wurden die *phnJ*-Sequenzen von A17:32 (phylogenetische Ähnlichkeit mit *Paenibacillus* sp.) und NM:5 (phylogenetische Ähnlichkeit mit *Paenibacillus alginolyticus*) mitberücksichtigt (siehe 4.5.3). Die Primer *phnJ1* und *phnJoc1* waren nahezu identisch. Der Primer *phnJoc1* war um 2 bp kürzer als *phnJ1* und enthielt weniger degenerierte Stellen. Die virtuelle PCR (siehe 3.4.11) mit dem Primerpaar *phnJoc1/phnJoc2* (siehe 3.4.2.2) ergab eine theoretische Fragmentlänge von 374 bp innerhalb verschiedener Bakteriengruppen (Tab. 16). Mit einer Ausnahme (*Mesorhizobium loti* BA000012) wurde dabei immer das *phnJ*-Gen detektiert. Die *phnJ*-Gene von A17:32 und NM:5 tauchten in der virtuellen PCR nicht auf, da die entsprechenden Sequenzen nicht in einer öffentlichen Datenbank aufgenommen wurden.

Tab. 16: Ergebnisse der virtuellen PCR mit dem Primerpaar phnJoc1/phnJoc2

Fehlpaarungen phnJoc1	Fehlpaarungen phnJoc2	Organismus	DNS- Region/Protein	Größe des PCR- Fragments
0	0	<i>Mesorhizobium loti</i> pMLa (BA000013)	PhnJ	374 bp
0	0	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> (BA000028)	PhnJ	374 bp
0	0	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2 (CP000250)	PhnJ	374 bp
0	0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (AL591985; M96263)	<i>phnJ</i>	374 bp
1	0	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AE007958)	<i>phnJ</i>	374 bp
0	1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (BA000040)	<i>phnJ</i>	374 bp
0	1	<i>Burkholderia mallei</i> (CP000010)	<i>phnJ</i>	374 bp
0	1	<i>Burkholderia pseudomallei</i> (CP000124), <i>B. pseudomallei</i> K96243 (BX571965)	<i>phnK</i> ; <i>phnJ</i>	374 bp
0	1	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i> (BX950851)	<i>phnJ</i>	374 bp
1	0	<i>Mesorhizobium loti</i> pMLa (BA000013)	PhnJ	374 bp
1	0	<i>Rhizobium etli</i> (CP000133)	<i>phnJ</i>	374 bp
0	1	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009 (BX572595)	<i>phnJ</i>	374 bp
1	1	<i>E. coli</i> O157 (AE005174; BA000007), <i>E. coli</i> K12 (U14003; U00096), <i>E. coli</i> CFT073 (AE013674), <i>E. coli</i> W3110 (AP009048)	<i>phnJ</i> ; PhnJ	374 bp
1	1	<i>Mesorhizobium loti</i> (BA000012)	hypothetisches Protein	374 bp
1	1	<i>Nostoc</i> sp. (BA000019)	<i>phnJ</i>	374 bp
1	1	<i>Shigella dysenteriae</i> (CP000034)	<i>phnJ</i>	374 bp
1	1	<i>Shigella boydii</i> (CP000036)	<i>phnJ</i>	374 bp
1	1	<i>Shigella sonnei</i> (CP000038)	<i>phnJ</i>	374 bp
0	2	<i>Silicibacter pomeroyi</i> (CP000031)	<i>phnJ</i>	374 bp
1	2	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (CP000112)	PhnJ	374 bp
1	2	<i>Mesorhizobium loti</i> R7A symbiosis island (AL672114)	<i>phnJ</i>	374 bp
2	1	<i>Yersinia pestis</i> (AE013674), <i>Y.</i> <i>pestis</i> Biovar Medievalis (AE017129), <i>Y. pestis</i> CO92 (AJ414157)	<i>phnJ</i>	374 bp
2	1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (BX936398)	<i>phnJ</i>	374 bp

4.7.2 Detektion eines *phnJ*-Genfragments in *Oceanobacillus iheyensis*, A17:32 und NM:5 mit dem Primerpaar *phnJoc1/phnJoc2*

Die Bedingungen der PCR mit den neu konstruierten Primern *phnJoc1* und *phnJoc2* konnten erfolgreich optimiert werden (siehe 3.4.2.3). Zur Amplifizierung des *phnJ*-Gens wurden die Primerkonzentration und die Zyklenanzahl reduziert, um die Anzahl unspezifischer PCR-Produkte zu reduzieren. Das *phnJ*-Genfragment der DNS von *Oceanobacillus iheyensis*, A17:32 (phylogenetische Ähnlichkeit mit *Paenibacillus* sp.) und NM:5 (phylogenetische Ähnlichkeit mit *Paenibacillus alginolyticus*) konnte detektiert werden (Abb. 27). Die PCR-Produkte wiesen hierbei in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der virtuellen PCR eine erwartete Größe von ca. 370 bp auf. Für *O. iheyensis* wurde durch Sequenzierung die Spezifität der Primer bestätigt. *O. iheyensis* wurde als Positivkontrolle gewählt, da die Sequenz des *phnJ*-Gens zur Konstruktion des Primerpaares *phnJoc1/phnJoc2* verwendet wurde.

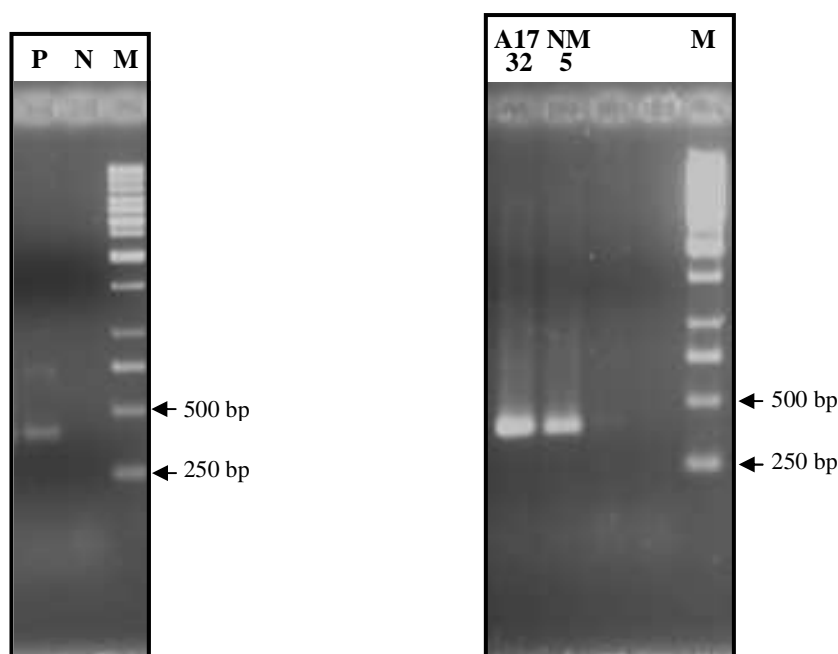


Abb. 27: Agarosegele der PCR-Produkte von *phnJ*; P: Positivkontrolle (*O. iheyensis*); N: Negativkontrolle; M: 1 kb DNS Marker; A17:32: *Paenibacillus* sp.; NM:5: *P. alginolyticus*

4.7.3 Nachweis von *phnJ*-Genfragmenten mit dem Primerpaar *phnJoc1* und *phnJoc2* im Boden

Die Auswirkungen von Glyphosat auf Mikroorganismen, die am Phosphonatabbau beteiligt waren, wurden durch den Nachweis von *phnJ*-Genen im Boden untersucht. Dazu wurden aus jedem Mikrokosmos vierzehn Tage nach Applikation von Glyphosat drei unabhängige

Parallelen entnommen und analysiert (siehe 3.4.2.3). Es gelang mit dem Primerpaar *phnJoc1/phnJoc2*, in allen vier Bodenproben (schluffiger Boden A17/sandiger Boden NM mit/ohne Glyphosatbeaufschlagung) ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von ca. 370 bp zu amplifizieren (Abb. 28). Im Bereich über 370 bp wurden hierbei auch unspezifische Zielsequenzen vervielfältigt. Diese waren vernachlässigbar, da die PCR-Produkte der gewünschten Größe aus dem Gel ausgeschnitten wurden (siehe 3.4.3).

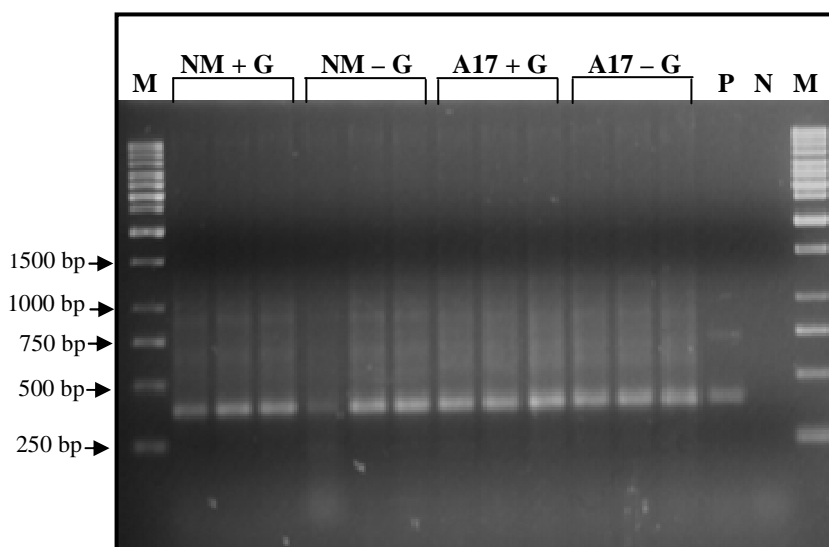


Abb. 28: Agarosegel der PCR-Produkte von *phnJ* mit dem Primerpaar *phnJoc1/phnJoc2*; NM + G: sandiger Boden vom Standort Neumarkt nach Glyphosatapplikation im Mikrokosmenexperiment; NM - G: ohne Glyphosatapplikation; A17 + G: schluffiger Boden vom Standort Scheyern nach Glyphosatapplikation im Mikrokosmenexperiment; A17 - G: ohne Glyphosatapplikation

Die PCR-Produkte wurden mit dem Vektor PCR[®]2.1 ligiert (siehe 3.4.4). Pro Boden und Behandlungsform wurden 40 Klone nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und sequenziert (siehe 3.4.11; Tab. 17, 18).

In beiden Böden wurden mit dem in dieser Arbeit entwickelten Primersystem neben den erwarteten *phnJ*-Genfragmenten auch unspezifische Zielsequenzen detektiert (32,5 – 65 %). Während die erwarteten *phnJ*-Genfragmente mit den Primern *phnJoc1* und *phnJoc2* detektiert wurden, wurden unspezifische Zielsequenzen dadurch detektiert, dass der Primer *phnJoc1* zwei Mal gebunden hatte. Die Sequenzen, die durch die Bindung des Primers *phnJoc1* generiert wurden, waren dabei untereinander nicht verwandt. Die Primerbindungsstellen waren mit wenigen Fehlpaarungen nachweisbar. Wurden die 79 unspezifischen Zielsequenzen in Aminosäuren umgeschrieben, zeigten sieben dieser Sequenzen (A17+ Gly: 16; 30; 31; 25; 40; A17-Gly: 1; 5) Ähnlichkeiten von ca. 40 % zu Glycosyltransferasen.

Bei den Organismen, zu denen die in diesem Ansatz gefundenen PhnJ-Sequenzen Ähnlichkeiten zeigten, handelte es sich ausschließlich um α -Proteobakterien.

Tab. 17: Ergebnis der Sequenzierung von je 40 zufällig ausgewählten Klonen (PCR-Produkte mit Primerpaar phnJoc1/phnJoc2) vom Standort Scheyern; A17 – Gly: schluffiger Boden vom Standort Scheyern ohne Glyphosatapplikation im Mikrokosmenexperiment; A17 + Gly: nach Glyphosatapplikation; *: nicht auswertbar, da Mischsequenz

Sequenz (A17 - Gly)	Prozentsatz	Protein	Ähnlichkeit	Organismus
39	2,5 %	Phosphonatmetabolismusprotein	84 % (123/146)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
31	2,5 %	Phosphonatmetabolismusprotein	82 % (120/146)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
4, 10, 11, 13, 15, 21, 22, 23, 26, 35, 38,	27,5 %	PhnJ (Phosphonatmetabolismusprotein)	87 % (115/131) - 96 % (126/131)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5
17	2,5 %	Phosphonatmetabolismusprotein	93 % (122/131)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2
1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 14, 16, 18, 19, 20, 24, 25, 27, 28, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 40	57,5 %	hypothetische Funktion/Ähnlichkeiten in sehr kurzen Sequenzabschnitten	-	-
8	2,5 %	Translationselongationsfaktor Tu	77 % (91/117)	<i>Nitrosospora multiformis</i>
12	2,5 %	Glycerolkinase	74 % (81/109)	<i>Streptomyces coelicolor</i>
29*	2,5 %	-	-	-
Sequenz (A17 + Gly)	Prozentsatz	Protein	Ähnlichkeit	Organismus
3, 4, 7, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 22, 23, 24, 27, 29, 32, 33, 34, 39	47,5 %	PhnJ (Phosphonatmetabolismusprotein)	84 % (111/131) - 96 % (126/131)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5
21	2,5 %	Phosphonatmetabolismusprotein	93 % (123/131)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2
1, 2, 5, 6, 8, 9, 12, 16, 17, 20, 25, 26, 28, 30, 31, 35, 36, 37, 38, 40	50,0 %	hypothetische Funktion/Ähnlichkeiten in sehr kurzen Sequenzabschnitten	-	-

Tab. 18: Ergebnis der Sequenzierung von je 40 zufällig ausgewählten Klonen (PCR-Produkte mit Primerpaar phnJoc1/phnJoc2) vom Standort Neumarkt; NM – Gly: sandiger Boden vom Standort Neumarkt ohne Glyphosatapplikation im Mikrokosmenexperiment; NM + Gly: nach Glyphosatapplikation; *: nicht auswertbar, da Mischsequenz

Sequenz (NM - Gly)	Prozentsatz	Protein	Ähnlichkeit	Organismus
36	2,5 %	PhnJ (Phosphonat-metabolismusprotein)	77 % (104/134)	<i>Acidiphilium cryptum</i>
14, 25	5,0 %	Phosphonatmetabolismusprotein	82 % (121/146), 87 % (128/146)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
6	2,5 %	PhnJ (Nutzung von Alkylphosphonat)	75 % (120/159)	<i>Rhodobacterales bacterium</i>
32	2,5 %	C-P-Lyasekomponentenprotein	86 % (127/146)	<i>Rhizobium etli</i>
3, 4, 7, 10, 11, 13, 15, 20, 27, 31, 33, 38, 39, 40	35,0 %	PhnJ (Phosphonat-metabolismusprotein)	94 % (124/131), 95 % (125/131) oder 96 % (126/131)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5
9	2,5 %	PhnJ (Nutzung von Alkylphosphonat)	66 % (106/159)	<i>Sulfitobacter</i> sp.
1, 2, 5, 8, 12, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 30, 37	45,0 %	hypothetische Funktion/Ähnlichkeiten in sehr kurzen Sequenzabschnitten	-	-
34	2,5 %	Penicillinbindeprotein	95 % (99/104)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5
35	2,5 %	Elektronentransportprotein	67 % (82/121)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5
Sequenz (NM + Gly)	Prozentsatz	Protein	Ähnlichkeit	Organismus
20	2,5 %	PhnJ (Phosphonat-metabolismusprotein)	77 % (105/136)	<i>Acidiphilium cryptum</i>
26	2,5 %	Phosphonatmetabolismusprotein	88 % (129/146)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
6, 34	5,0 %	Phosphonatmetabolismusprotein	80 % (118/146), 82 % (120/146)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
39	2,5 %	PhnJ (Phosphonat-metabolismusprotein)	69 % (111/160)	<i>Paracoccus denitrificans</i>
30	2,5 %	C-P-Lyasekomponentenprotein	79 % (127/159)	<i>Rhizobium etli</i>
14	2,5 %	PhnJ (Nutzung von Alkylphosphonat)	72 % (115/159)	<i>Rhodobacterales bacterium</i>
1, 2, 4, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 33, 35, 36, 38, 40	47,5 %	PhnJ (Phosphonat-metabolismusprotein)	92 % (121/131) - 96 % (126/131)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5
17	2,5 %	PhnJ (Phosphonat-metabolismusprotein)	95 % (125/131)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2
5, 7, 8, 9, 10, 12, 27, 28, 29, 31, 32, 37	30,0 %	hypothetische Funktion/Ähnlichkeiten in sehr kurzen Sequenzabschnitten	-	-
3*	2,50%	-	-	-

Für alle detektierten *phnJ*-Sequenzen wurden pro Behandlungsform Rarefactionkurven erstellt (siehe 3.4.12). In diesen Kurven wurde die Anzahl an verschiedenen *phnJ*- und PhnJ-Sequenzen gegen die Anzahl analysierter Klone aufgetragen, um festzustellen, ob die Anzahl untersuchter Klone ausreichte, die Diversität der *phnJ*-Gene und PhnJ-Sequenzen in den einzelnen Habitaten abzudecken. Dabei wurden auf DNS-Ebene von den Unterschieden der *phnJ*-Genfragmente von *Bradyrhizobium japonicum* und *Bradyrhizobium* sp. ausgehend Differenzen von über 11,5 % als unterschiedliche Sequenzen gewertet. Auf Aminosäureebene wurden ebenfalls von den Differenzen der PhnJ-Sequenzen von *B. japonicum* und *Bradyrhizobium* sp. ausgehend Unterschiede von über 4,6 % als unterschiedliche Sequenzen gewertet.

Wie aus Abbildung 29 hervorgeht, wurde für A17 + Gly (Standort Scheyern mit Glyphosatapplikation im Mikrokosmenexperiment) ein Plateau erreicht. Auf DNS-Ebene wurden sechs verschiedene *phnJ*-Genfragmente, auf Proteinebene drei unterschiedliche PhnJ-Sequenzen entdeckt. Es ist davon auszugehen, dass die für diesen Boden charakteristischen *phnJ*-Gene und PhnJ-Sequenzen identifiziert werden konnten. Für den Standort A17 – Gly (*phnJ*-Genfragmente: 7; PhnJ-Sequenzen: 6) wurde noch kein Plateau erreicht, was auf eine höhere Diversität der *phnJ*-Genfamilie schließen ließ. Dennoch wurden bisher schon mehr *phnJ*-Gene und PhnJ-Sequenzen detektiert als nach dem Zusatz von Glyphosat. Die Applikation von Glyphosat bewirkte folglich beim schluffigen Boden des Standortes A17 eine Reduktion der PhnJ-Diversität. Bei dem sandigen Boden der Standorte NM + Gly (*phnJ*-Genfragmente: 20; PhnJ-Sequenzen: 13) und NM – Gly (*phnJ*-Genfragmente: 10; PhnJ-Sequenzen: 9) wurde noch kein Plateau erreicht. Dies ließ darauf schließen, dass mehr als 40 Klone analysiert werden sollten, um genauere Informationen über die Diversität der bakteriellen *phnJ*-Sequenzen in diesem Habitat zu erhalten. Tendenziell schien für den Standort NM der Zusatz von Glyphosat die Diversität der *phnJ*-Gene und PhnJ-Sequenzen zu vergrößern. Jedoch war eine eingehende Untersuchung der Diversität der bakteriellen *phnJ*-Gene in den einzelnen Habitaten im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

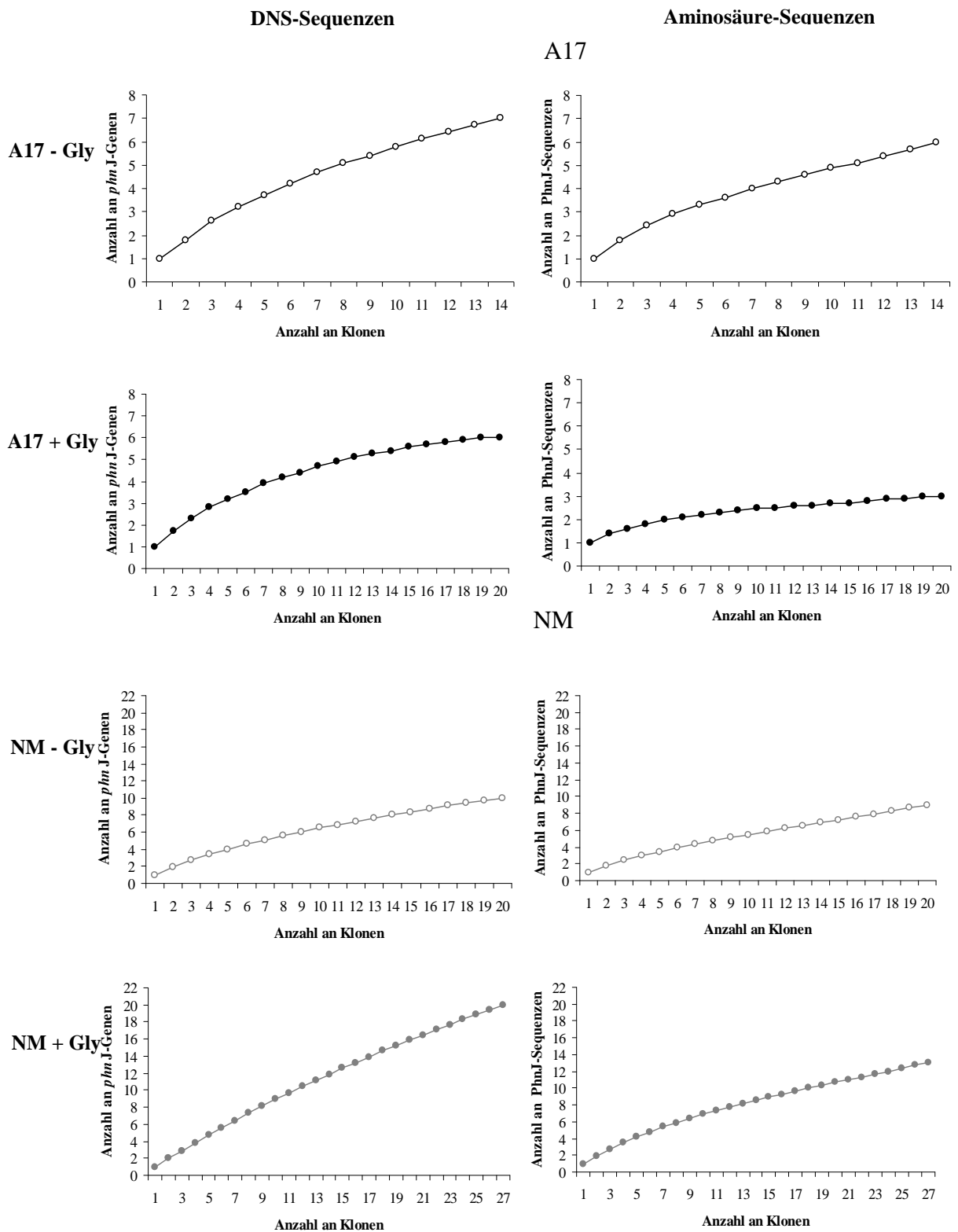


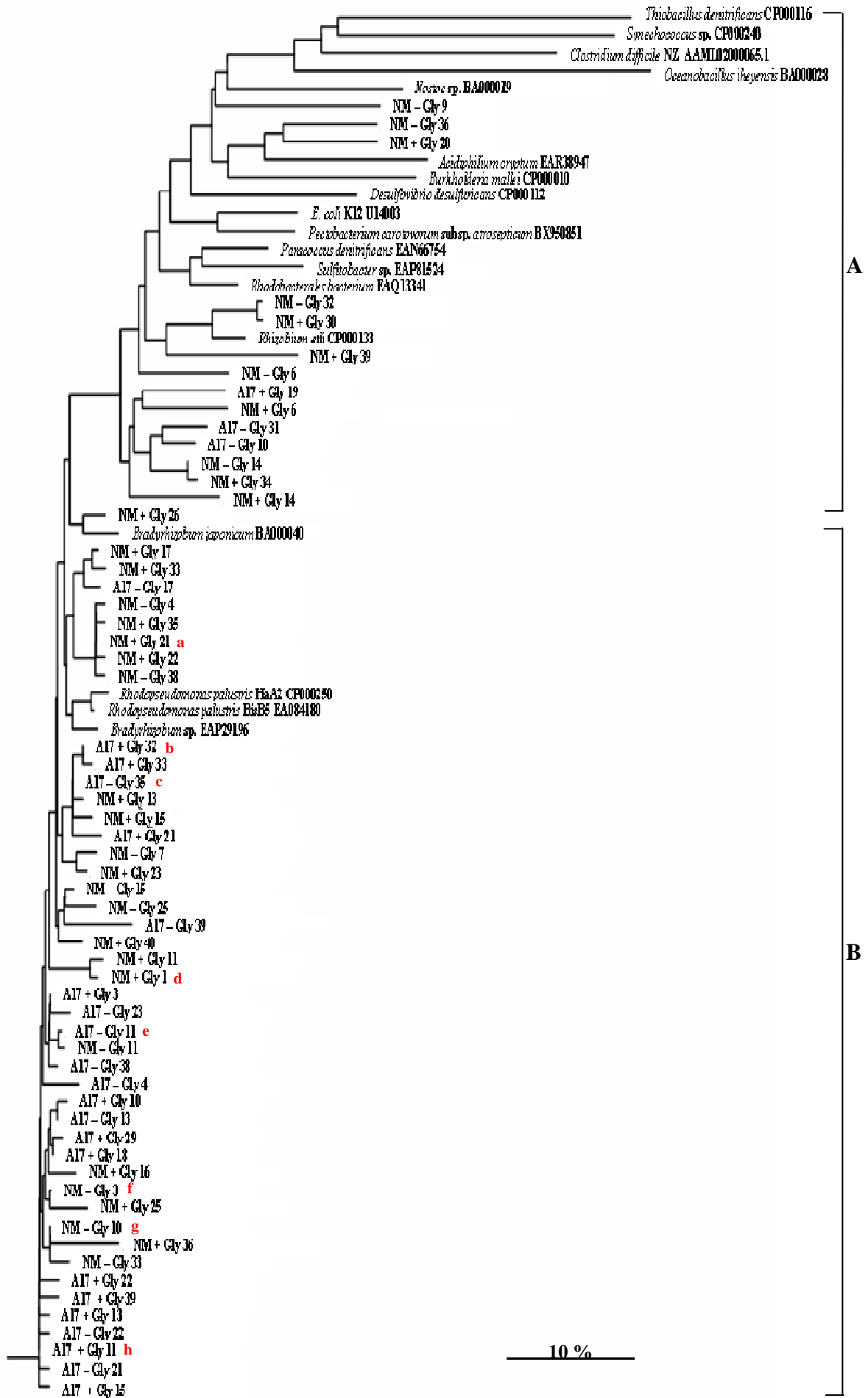
Abb. 29: Rarefactionkurven: Anzahl an unterschiedlichen bakteriellen *phnJ*- und *PhnJ*-Sequenzen aufgetragen als Funktion der Anzahl an Klonen; A17 – Gly: schluffiger Boden des Standortes Scheyern ohne Glyphosatapplikation im Mikrokosmenexperiment; A17 + Gly: mit Glyphosatapplikation; NM – Gly: sandiger Boden des Standortes Neumarkt ohne Glyphosatapplikation im Mikrokosmenexperiment; NM + Gly: mit Glyphosatapplikation

Sämtliche PhnJ-Sequenzen von A17 und NM konnten in einer phylogenetischen Analyse (siehe 3.4.11) den beiden Gruppen A und B zugeordnet werden (Abb. 30). Der Großteil der PhnJ-Sequenzen wurde dabei der Gruppe B zugewiesen. In dieser Gruppe befanden sich PhnJ-Sequenzen aller Standorte (NM; A17) und Behandlungsformen (mit/ohne Glyphosat-beaufschlagung). Diese nah verwandten Sequenzen konnten phylogenetisch zu den PhnJ-Sequenzen von *Rhodopseudomonas palustris*, *Bradyrhizobium japonicum* und *Bradyrhizobium* sp. eingeordnet werden.

Die übrigen PhnJ-Sequenzen konnten der Gruppe A zugeordnet werden. In dieser Gruppe dominierten die PhnJ-Sequenzen des sandigen Bodens vom Standort NM, wobei bemerkt werden muss, dass insgesamt von diesem Standort mehr PhnJ-Sequenzen (47) als vom schluffigen Boden des Standortes Scheyern A17 (34) zur Verfügung standen. Dennoch waren auch in dieser Gruppe PhnJ-Sequenzen aller Standorte und Behandlungsformen vertreten. Eine genauere Zuordnung dieser PhnJ-Sequenzen war allerdings nicht möglich, da keine entsprechenden PhnJ-Referenzsequenzen in der Datenbank vorhanden waren.

Eine Gruppierung der PhnJ-Sequenzen bezüglich der Standorte (A17: schluffiger Boden; NM: sandiger Boden) und der Behandlungsform (Glyphosatapplikation; keine Glyphosatapplikation) konnte nicht festgestellt werden.

Abb. 30: Phylogenetischer Stammbaum: Verwandtschaft der bakteriellen PhnJ-Sequenzen aller untersuchten Habitate und der Referenzorganismen der Datenbank; NM + Gly: sandiger Boden vom Standort Neumarkt mit Glyphosatapplikation im Mikrokosmenexperiment; NM – Gly: ohne Glyphosatapplikation; A17 + Gly: schluffiger Boden vom Standort Scheyern mit Glyphosatapplikation im Mikrokosmenexperiment; A17 – Gly: ohne Glyphosatapplikation; Cluster: A, B; a – g: jeweils identische Sequenzen; **a:** NM – Gly 27; NM – Gly 31; **b:** A17 – Gly 26; **c:** NM + Gly 38; A17 + Gly 4; **d:** NM + Gly 19; **e:** A17 + Gly 7; A17 + Gly 27; **f:** NM + Gly 2; NM + Gly 24; NM – Gly 20; NM – Gly 39; **g:** NM + Gly 4; NM – Gly 13; NM – Gly 40; **h:** A17 + Gly 14; A17 + Gly 23; A17 + Gly 24; A17 + Gly 34; A17 – Gly 15; NM + Gly 18; Rekonstruktion des Stammbaumes nach der Neighbour Joining Methode



5. Diskussion

Um das Ziel dieser Arbeit, das mikrobielle Potenzial des Glyphosatabbaus zu charakterisieren, zu erreichen, liegen spezifische Ergebnisse für zwei ausgewählte, unterschiedliche Böden vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Operonstrukturen zu identifizieren, die für den Abbau von Glyphosat verantwortlich sind, um gegebenenfalls geeignete Maßnahmen zu entwickeln, um diesen Genpool gezielt zu stimulieren. Dieser Genpool soll nun im Hinblick auf Beeinflussbarkeit und Stimulierbarkeit dargestellt werden. Über zwei Böden liegen nun Daten vor.

5.1 Einfluss von Glyphosat auf die Bodenmikroflora

Die Parameter CO₂, N₂O und CH₄ wurden im Mikrokosmenexperiment gemessen, um den globalen Einfluss von Glyphosat auf die mikrobielle Aktivität der beiden Böden NM und A17 zu bestimmen. Eine signifikante Stimulierung der mikrobiellen Aktivität durch Glyphosat wurde bereits nachgewiesen (Haney *et al.*, 2000).

Die Applikation von Glyphosat führte in dem sandigen Boden (NM) zu einer Erhöhung der CO₂-Produktion. Eine erhöhte CO₂-Emission als Stressantwort der Bodenmikroorganismen kann dabei ausgeschlossen werden, da bei der hier eingesetzten Glyphosattmenge und der Aufbringung von Glyphosat auf den Boden die Toxizität vernachlässigbar ist (Busse *et al.*, 2001). Obwohl NM in der Vergangenheit nicht mit Glyphosat in Berührung gekommen ist, konnte Glyphosat mineralisiert werden. Die Fähigkeit zum Glyphosatabbau ist in Bakterien ubiquitär vorhanden (Dick und Quinn, 1995). Zwischen einer wiederholten Glyphosat-aufbringung und einer beschleunigten Mineralisierung des Herbizids konnte in einigen Böden ein Zusammenhang hergestellt werden (Quinn *et al.*, 1988), während in anderen Böden kein Zusammenhang festgestellt wurde (Busse *et al.*, 2001). Die Abbaurate von Glyphosat im Boden wurde im Labor häufig durch die Aufbringung von ¹⁴C-Glyphosat und die Messung der ¹⁴CO₂-Freisetzung bestimmt (Getenga und Kengara, 2004; Moshier und Penner, 1978; Reimer *et al.*, 2005; von Wirén-Lehr *et al.*, 1997). Um die Herkunft des aus dem sandigen Boden NM freigesetzten Kohlendioxids eindeutig zu bestimmen, müsste der Versuch mit ¹⁴C-Glyphosat wiederholt werden. Gründe dafür, dass in A17 durch die Glyphosatapplikation kein CO₂-Anstieg zu verzeichnen war, können einerseits eine zu geringe aufgebrachte Glyphosatkonzentration und andererseits eine geringe Bioverfügbarkeit von Glyphosat im schluffigen

Boden A17 sein. Die Bioverfügbarkeit von Glyphosat im Boden ist von der Adsorption des Herbizids an Bodenpartikel abhängig. Sorensen *et al.* (2006) konnten in den unteren Bereichen eines Bodenprofils einen Zusammenhang zwischen einer hohen Adsorption und einer geringen Desorption von Glyphosat und keiner bzw. einer verringerten Mineralisierung aufgrund einer verringerten Bioverfügbarkeit von Glyphosat feststellen. Die Adsorption von Glyphosat ist positiv mit dem Eisen- und Aluminiumgehalt und dem Gehalt an Tonmineralien im Boden korreliert (Gerritse *et al.*, 1996). Da A17 einen fast viermal höheren Tongehalt und einen ca. sechsmal höheren Schluffgehalt als NM aufweist, kann angenommen werden, dass die Adsorption von Glyphosat in A17 höher ist als in NM. In Bioabbauversuchen mit ^{14}C -Glyphosat wurde für den sandigen Boden NM ein Abbau von 19 % innerhalb von 15 Tagen ermittelt (Grundmann und Loos, persönliche Mitteilung). Für A17 liegen keine vergleichbaren Untersuchungen vor.

In beiden Böden (A17; NM) wurde nach der Applikation von Glyphosat (Säureform) ein Anstieg der N_2O -Bildung festgestellt. Dies weist auf die Stimulierung der Nitrifikation oder der Denitrifikation in beiden Böden durch Glyphosat hin. Für Glyphosat (Säureform) und eines seiner Abbauprodukte AMPA wurde ebenfalls eine Stimulierung der Denitrifikation nachgewiesen (Pell *et al.*, 1998). In einem aquatischen Sediment hingegen wurde bei hohen Glyphosatkonzentrationen gezeigt, dass Nitrifikationsprozesse inhibiert wurden (Enrich-Prast, 2006). Für einige Herbizide (Atrazin und Simazin) wurde eine vollständige Inhibierung der denitrifizierenden Aktivitäten eines *Xanthobacter autotrophicus*-Stammes beschrieben (Saez *et al.*, 2006). Auch für die Herbizide Ioxynil und Prosulfuron wurde mit steigenden Konzentrationen eine Inhibierung der Denitrifikation festgestellt (Pell *et al.*, 1998; Kinney *et al.*, 2005). Für andere Herbizide wie Butachlor konnte eine anfängliche Stimulierung der Nitrifikation in Reisböden nachgewiesen werden (Min *et al.*, 2001). Auch wurde eine erhöhte Denitrifikation nach der Applikation von Herbiziden wie Alloxymid und Dalapon-Na auf den Boden beschrieben (Pell *et al.*, 1998).

Im sandigen Boden NM wurden für N_2O deutlich höhere Werte, für CO_2 hingegen tendenziell höhere Werte als im schluffigen Boden A17 gemessen. Diese unterschiedliche mikrobielle Aktivität kann durch Differenzen in der Verfügbarkeit und der Art der N- und C-Quellen in den beiden Böden bedingt sein. Lee *et al.* (2006) stellten in Felduntersuchungen fest, dass Unterschiede in Spurengasemissionen eher von biochemischen Parametern als von physikalischen Parametern abhängen.

Die Methanogenese blieb in beiden Böden (A17; NM) durch die Aufbringung von Glyphosat unbeeinflusst. Ein Zusammenhang zwischen der Applikation von Glyphosat und der Beeinflussung der Methanogenese wurde bisher nicht festgestellt. Für das Herbizid Butachlor wurde hingegen in Reisböden bei unterschiedlichen Herbizidkonzentrationen eine Inhibierung der Methanbildung festgestellt (Mohanty *et al.*, 2004).

Die Beregnung hatte in beiden Böden einen Anstieg der CO₂- und N₂O-Emissionen und eine geringe Erhöhung der CH₄-Emission zur Folge. Die Beregnung hatte dabei einen größeren Einfluss als der Bodentyp. Ein Zusammenhang zwischen der Beregnung und der Erhöhung der CO₂-, N₂O und CH₄-Emissionen wurde bereits dargelegt (Fan und Haruo, 2004; Lee *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2003). Die geringe Beeinflussung der Methanogenese durch die Beregnung könnte auf ein zu hohes Redoxpotential und einen zu niedrigen pH-Wert (A17: 5,9; NM: 4,9) zurückgeführt werden. Methanogene Bakterien erreichen ihre optimale Aktivität nämlich bei einem niedrigen Redoxpotenzial und einem neutralen pH-Wert (Oremland, 1988).

5.2 Vorkommen von glyphosatabbauenden Bakterien

5.2.1 Glyphosatabbaufähigkeit der Bodenisolat

Es konnten zwei Bodenisolat (A17:41; NM:37) isoliert werden, die im INT-Test ein positives Ergebnis lieferten und somit Glyphosat als einzige P-Quelle nutzen konnten. Diese Isolate hatten eine phylogenetische Ähnlichkeit mit *Rhizobium gallicum*. Liu *et al.* (1991) konnten zeigen, dass in der Familie der *Rhizobiaceae* die Fähigkeit zum Glyphosatabbau weit verbreitet ist. *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium galega* und *Sinorhizobium trifolii* konnten mit Glyphosat als einziger P-Quelle wachsen. *Sinorhizobium meliloti* bildete dabei als unmittelbares Abbauprodukt Sarkosin. In der vorliegenden Arbeit wurde das von Liu *et al.* (1991) verwendete Medium eingesetzt mit der Modifikation, dass ausschließlich Glucose als C-Quelle verwendet wurde. Mit dem Primerpaar phnJ1/phnJ2 konnte in Übereinstimmung mit der virtuellen PCR kein Fragment der gewünschten Größe amplifiziert werden. Die entsprechenden Isolate nutzten entweder einen anderen als den C-P-Lyaseweg oder die Primer phnJ1 und phnJ2 waren zu spezifisch. Auf die Reduzierung der Glyphosatkonzentration wurden die beiden Isolate (A17:41; NM:37) nicht überprüft. Die Fähigkeit von Rhizobien zum Glyphosatabbau ist in diesem Zusammenhang auch ökologisch sehr interessant, da nachgewiesen wurde, dass Glyphosat in den

Wurzelknöllchen von glyphosatresistentem Soja akkumuliert (Grundmann, persönliche Mitteilung).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Glyphosatabbau stammspezifisch ist. Nur eines (A17:32) der sieben Bodenisolat, die eine phylogenetische Ähnlichkeit mit *Paenibacillus* sp. aufwiesen, war im INT-Test positiv und konnte die Glyphosatkonzentration herabsetzen. Auch Pipke und Amrhein (1988) konnten in nur einem von zwei untersuchten *Arthrobacter* sp.-Stämmen die Nutzung von Glyphosat als einziger P-Quelle nachweisen.

Die gewählten Medienbedingungen spielten beim Nachweis der Glyphosatabbaufähigkeit und der Isolierung der Bodenisolat eine bedeutende Rolle. Die Bodenisolat, die eine phylogenetische Ähnlichkeit mit *Bacillus megaterium* (A17:36), *Arthrobacter* sp. (A17:34) und *Pseudomonas* sp. (A17:3) aufwiesen, konnten Glyphosat unter den hier gewählten Versuchsbedingungen nicht als einzige P-Quelle verwenden, obwohl ihre Glyphosatabbaufähigkeit bereits beschrieben wurde (Quinn *et al.*, 1989; Pipke *et al.*, 1987; Dick und Quinn, 1995). Auch konnten Vertreter der im Boden häufig vorkommenden Bakteriengattungen *Streptomyces* und *Flavobacterium* in dem hier beschriebenen Ansatz nicht nachgewiesen werden. Obojska *et al.* (1999) wiesen nach, dass *Streptomyces* sp. Glyphosat als einzige P- und N-Quelle nutzen konnte, wobei Sarkosin beim Abbau freigesetzt wurde. Für die Isolierung von *Streptomyces* sp. wurde ein Medium mit einer anderen Zusammensetzung verwendet, das sich unter anderem in der Glyphosatkonzentration (10 mM), von dem in der vorliegenden Arbeit benutzten Medium (0,5 mM Glyphosat) unterschied. *Flavobacterium* sp. konnte Glyphosat unter der Freisetzung von AMPA abbauen (Balthazor und Hallas, 1986). Das zur Isolierung von *Flavobacterium* sp. eingesetzte Medium unterschied sich unter anderem dadurch, dass Gluconat und Pyruvat als C-Quellen dienten. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen nur Glucose als C-Quelle verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Bakterien untersucht, da der Glyphosatabbau in Bakterien besser dokumentiert ist. Über die Rolle von Pilzen für den Glyphosatabbau im Boden ist wenig bekannt. Da Pilze für die Assimilation der meisten Organophosphonate im Boden verantwortlich sind (Kafarski *et al.*, 2001), dürften sie auch eine wichtige Rolle im Glyphosatabbau spielen. Beispielsweise konnten sieben von 26 untersuchten Pilzstämmen Glyphosat als einzige P-Quelle nutzen (Krzysko-Lupicka *et al.*, 1997).

5.2.2 Verwendung des C-P-Lyaseweges

Die Glyphosatabbaufähigkeit von Bakterien wird üblicherweise durch Wachstum auf ^{14}C -Glyphosat und den Nachweis eines Abbauproduktes erbracht (Dick und Quinn, 1995; Kertesz *et al.*, 1991; Kishore und Jacob, 1987; Pipke und Amrhein, 1988). In der vorliegenden Arbeit wurde kein radioaktiv markiertes Glyphosat eingesetzt. Es wurde festgestellt, ob ausgewählte Isolate die Glyphosatkonzentration im Versuchsverlauf unter den gewählten Versuchsbedingungen herabsetzen konnten.

Die Isolate der vorliegenden Arbeit, die eine phylogenetische Ähnlichkeit zu *Paenibacillus* sp. (A17:32), *Paenibacillus alginolyticus* (NM:5), *Rhodococcus* sp. (A17:35) und *Burkholderia hospita* (NM:50) aufwiesen, konnten die Glyphosatkonzentration verringern. Die Verringerung der Glyphosatkonzentration weist den Transport von Glyphosat in das Zellinnere nach, der Abbau kann erst durch den Nachweis von Metaboliten erbracht werden. Das mangelnde Wachstum von *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752 ist auf das in dieser Arbeit verwendete MOPS-Medium zurückzuführen, da für diesen Stamm die Glyphosatabbaufähigkeit bereits beschrieben wurde (Pipke und Amrhein, 1988).

Bei den zum Glyphosatabbau befähigten Isolaten, die eine phylogenetische Ähnlichkeit mit *Paenibacillus* sp. (A17:32) und *Paenibacillus alginolyticus* (NM:5) zeigten, konnte mit dem Primerpaar phnJ1/phnJ2 das *phnJ*-Gen und somit das C-P-Lyaseoperon nachgewiesen werden. In der virtuellen PCR (Tab. 10) wurde mit dem Primersystem phnJ1/phnJ2 kein *phnJ*-Gen von *Paenibacillus* erfasst. Dies ist dadurch begründet, dass in der Datenbank keine *phnJ*-Gensequenzen von Vertretern der Gattung *Paenibacillus* vorlagen. Dagegen wurde in der virtuellen PCR das *phnJ*-Gen von *Oceanobacillus iheyensis* erkannt. *Oceanobacillus* und *Paenibacillus* sind miteinander verwandt und gehören beide der Ordnung *Bacillales* an. Der Nachweis des *phnJ*-Gens weist darauf hin, dass in den beiden Isolaten A17:32 und NM:5 Glyphosat und andere Phosphonate über den C-P-Lyaseweg abgebaut werden. Es wurden allerdings mehrere Bakteriengenome beschrieben, die mehr als ein C-P-Lyaseoperon enthielten. In dem Genom von *Pseudomonas stutzeri* wurden beispielsweise zwei C-P-Lyaseoperone nachgewiesen, wobei Glyphosat nicht als Substrat genutzt werden konnte (White und Metcalf, 2004). Auch gibt es Hinweise darauf, dass *Arthrobacter* sp. mindestens zwei verschiedene C-P-Lyasesysteme enthält, dabei wird Glyphosat nur über einen der beiden C-P-Lyaseabbauwege abgebaut (Kertesz *et al.*, 1991). *Enterobacter aerogenes* schließlich

verfügt über zwei verschiedene Phosphonatabbauwege, den C-P-Lyaseweg und den Phosphonataseweg (Lee *et al.*, 1992). Auf die Fähigkeit zum Glyphosatabbau wurde dabei nicht eingegangen. Der endgültige Beweis, dass beide Isolate (A17:32; NM:5) Glyphosat über den C-P-Lyaseweg abbauen können, kann erst durch das Einfügen einer Deletion in das C-P-Lyaseoperon erbracht werden. Über welchen der beiden Abbauwege Glyphosat letztendlich abgebaut wird, kann erst durch den Nachweis eines der beiden Metabolite Sarkosin oder AMPA erbracht werden.

Für Vertreter der Gattung *Paenibacillus* wurde der Abbau von Glyphosat bisher nicht dokumentiert. Für *Geobacillus caldxylosilyticus*, der mit der Gattung *Paenibacillus* verwandt ist, wurde der Abbau von Glyphosat unter der Freisetzung von AMPA beschrieben (Obojska *et al.*, 2002). Dieses Isolat wurde aus Zentralheizungswasser gewonnen und konnte Glyphosat als einzige P-Quelle nutzen. Auch für *Bacillus megaterium*, das aus dem Boden isoliert wurde, wurde Wachstum auf Glyphosat als einziger P-Quelle nach einer lag-Phase beschrieben (Quinn *et al.* 1989).

Auch für Vertreter der Gattung *Rhodococcus* wurde der Glyphosatabbau bislang nicht dargestellt. Für andere grampositive Bakterien wie *Arthrobacter* sp. und *Arthrobacter atrocyaneus* wurde der Abbau von Glyphosat dagegen bereits erläutert. Sowohl *Arthrobacter* sp. als auch *Arthrobacter atrocyaneus* konnten mit ¹⁴C-Glyphosat als einziger P-Quelle wachsen. *Arthrobacter* sp. baute Glyphosat über das Intermediat Sarkosin ab (Pipke *et al.*, 1987), *Arthrobacter atrocyaneus* hingegen unter Freisetzung von AMPA (Pipke und Amrhein, 1988).

Der Abbau von Glyphosat von einem Vertreter der Gattung *Burkholderia* wurde bisher nicht beschrieben. Kuklinsky-Sobral *et al.* (2005) schilderten lediglich, dass endophytische *Burkholderia gladioli* in ihrem Wachstum auch durch hohe Glyphosatkonzentrationen nicht beeinträchtigt wurden.

Die beiden Isolate, die eine phylogenetische Ähnlichkeit mit *Rhodococcus* sp. (A17:35) und *Burkholderia hospita* (NM:50) aufwiesen, konnten Glyphosat als einzige P-Quelle nutzen. Mit dem Primerpaar phnJ1/phnJ2 konnte kein *phnJ*-Genfragment und folglich kein C-P-Lyaseoperon nachgewiesen werden. Ternan *et al.* (2000) konnten zeigen, dass *Burkholderia cepacia* ein anderes C-P spaltendes Enzym (Phosphonopyruvathydrolase) enthielt, das für

seine Aktivität keinen Phosphatmangel erforderte. Der fehlende Nachweis des C-P-Lyaseoperons in A17:35 und NM:50 deutet darauf hin, dass diese beiden Bodenisolat Glyphosat nicht über den C-P-Lyaseweg abbauen. Glyphosat könnte in diesen beiden Isolaten auch über einen bisher unbekannt Weg abgebaut werden. Möglich wäre allerdings auch, dass beide Isolate ein C-P-Lyaseoperon mit einem *phnJ*-Gen enthalten, welches mit dem Primersystem *phnJ1/phnJ2* nicht erkannt wird. In der virtuellen PCR (Tab. 10) wurde mit dem Primersystem *phnJ1/phnJ2* kein *phnJ*-Gen von *Rhodococcus* oder eines anderen hoch-GC Organismus erfasst. Die virtuelle PCR enthielt dagegen die *phnJ*-Gene einiger β -Proteobakterien. Ein Vertreter der Gattung *Burkholderia* war allerdings nicht darunter. Um gegebenenfalls die *phnJ*-Gene von *Rhodococcus* sp. und *Burkholderia hospita* zu erfassen, müssten spezifische Primersysteme entwickelt werden. Dies ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, da die entsprechenden *phnJ*-Gensequenzen nicht vorliegen.

In der Literatur wurden bislang nur spezifische Primer zum Nachweis des *phnJ*-Gens eines bestimmten Mikroorganismus beschrieben. Für den Nachweis des *phnJ*-Gens von *Sinorhizobium meliloti* beispielsweise wurden Primer entwickelt, mit denen dieses *phnJ*-Gen erfolgreich amplifiziert werden konnte (Parker *et al.*, 1999). Von Dyhrman *et al.* (2006) wurde ein Primerset konstruiert, mit dem das *phnJ*-Gen von *Trichodesmium erythraeum* durch ein 280 bp großes Amplifikat nachgewiesen werden konnte. Über welchen Abbauweg Glyphosat in den beiden Bodenisolaten A17:35 und NM:50 letztendlich abgebaut wird, kann erst durch den Nachweis von Intermediaten erbracht werden.

5.3 Metagenombank aus dem Boden NM nach Glyphosatapplikation

Metagenombanken ermöglichen den Zugang zu Genomsequenzen aus Ökosystemen einschließlich solcher von nichtkultivierbaren Mikroorganismen (Binnewies *et al.*, 2006). Metagenombanken aus dem Boden haben sich dabei als wertvolles Hilfsmittel zur Identifizierung neuer Genprodukte wie Amylasen (Rondon *et al.*, 2000), Lipasen (Henne *et al.*, 2000) und Sekundärmetaboliten wie Antibiotika (Gillespie *et al.*, 2002) erwiesen.

5.3.1 Generierung der Metagenombank

Die durch direkte Lyse gewonnene HMW-DNS aus dem sandigen Boden NM hatte eine Größe von 50 – 150 kb. Roh *et al.* (2006) konnten durch die Verwendung von vier verschiedenen Methoden der direkten Extraktion von DNS aus dem Boden (thermischer

Schock, "Bead Beating", heiße Lyse mit Detergens, Auftau- und Einfrierzyklen) nur relative kleine DNS-Fragmente einer Größe von 12 kb gewinnen. Die direkte Lyse von Mikroorganismen innerhalb der Bodenmatrix repräsentiert die mikrobielle Diversität besser als die vorherige Anreicherung und anschließende Lyse der Mikroorganismen. Auch Mikroorganismen, die an Bodenpartikel gebunden sind, werden lysiert (Daniel, 2004). Direkte Extraktionsmethoden liefern darüber hinaus eine 10- bis 100-fache Ausbeute an DNS verglichen mit indirekten Extraktionsmethoden (Gabor *et al.*, 2003; Roh *et al.*, 2006). Lysozym wurde zur Erhöhung des Anteils an grampositiven Bakterien zugesetzt. Krsek und Wellington (1999) dokumentierten, dass Lysozym auch die Reinheit der extrahierten DNS verbesserte. Das Problem der Koextraktion von polyphenolischen Verbindungen wie Huminstoffen, die an Nukleinsäuren binden können und enzymatische Reaktionen wie den Restriktionverdau und die Klonierung behindern können, wurde durch die elektrophoretische Abtrennung der Huminstoffe gelöst (Young *et al.*, 1993). Bei dem Boden NM handelte es sich um einen sehr sandigen Boden (85 % Sandgehalt), bei dem die Huminstoffe durch Elektrophorese leicht von der HMW-DNS abgetrennt werden konnten. Sandige Böden sind für die Konstruktion von Metagenombanken sehr gut geeignet. Wie von Osoegawa *et al.* (1998) beschrieben, blieb die Größe der HMW-DNS durch die Elektroelution unbeeinträchtigt.

Eine DNS-Bibliothek, die das gesamte Metagenom einer Bodenprobe repräsentiert, müsste schätzungsweise aus 10^6 BAC-Klonen mit Insertgrößen von 100 kb bestehen. Dies gilt unter der Annahme, dass alle Spezies mit der gleichen Häufigkeit vorkommen (Handelsman, 1998). Die Anzahl an Klonen, die hingegen statistisch nötig ist, um gewünschte Klone zu erhalten, ist von der Häufigkeit der Organismen, welche die entsprechenden Gene enthalten, im Boden abhängig (Gabor *et al.*, 2004a). In dem für die Konstruktion der Metagenombank verwendeten Boden NM der vorliegenden Arbeit konnte in Bioabbaueversuchen eine vollständige Mineralisierung von 19 % des aufgebrauchten Glyphosats bereits nach fünfzehn Tagen nachgewiesen werden (Grundmann und Loos, persönliche Mitteilung). Deshalb kann angenommen werden, dass zum Glyphosatabbau befähigte Bakterien in dem verwendeten Boden häufig vorkommen. Die Wahrscheinlichkeit, bestimmte Gene in einer Metagenombank zu finden, hängt auch von den Insertgrößen der DNS-Bibliothek und der Größe der Zielsequenzen ab (Gabor *et al.*, 2004b). Da die minimale Größe des C-P-Lyaseoperons 10,9 kb beträgt, um den Phosphonatabbau sicherzustellen (Yakovleva *et al.*, 1998), waren im vorliegenden Ansatz keine Insertgrößen von 100 kb erforderlich. Die Häufigkeit, mit der die gewünschten Gene in

der Metagenombank vorkommen, kann durch Selektionsdruck, der das Wachstum der Bakterien mit der angestrebten Aktivität begünstigt, erhöht werden (Gabor *et al.*, 2004a). Durch die Applikation von Glyphosat im Mikrokosmexperiment wurden selektive Bedingungen zur Anreicherung von glyphosatabbauenden Isolaten geschaffen.

Die Wahl des Expressionswirts fiel auf *E. coli*, da seine Anforderungen bezüglich der Promotorerkennung und der Initiation der Translation im Vergleich zu anderen Bakterien wie *Bacillus* und *Streptomyces* gering sind (Lorenz *et al.*, 2002a). Allerdings wurde dadurch in Kauf genommen, dass die Expression von Genen grampositiver Bakterien nur schwierig erfolgte.

Bei der in dieser Arbeit erstellten Metagenombank handelt es sich mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 18,6 kb um eine DNS-Bibliothek mit großen Inserts, da man ab einer Größe von 15 kb von großen Inserts spricht (Daniel, 2005). Die Metagenombank bestand aus 5079 Klonen, wobei 8,7 % der Klone kein Insert trugen. 11 % der Klone enthielten ein Insert einer Größe von 30 – 50 kb. Insgesamt befanden sich schätzungsweise 94,4 Mbp an DNS in der Metagenombank, was in etwa einer Anzahl an 94400 Genen entspricht. Von Rondon *et al.* (2000) wurde mit der Bibliothek SL1 eine ähnliche Metagenombank aus dem Boden beschrieben. Sie bestand aus 3648 Klonen, wobei 3 % der Klone kein Insert enthielten. Die durchschnittliche Insertgröße war mit 27 kb größer als die durchschnittliche Insertgröße der Klone der vorliegenden Arbeit. Etwa 20 % der Klone hatten eine Insertgröße von 30 – 50 kb. Insgesamt wurde die Größe der Metagenombank auf 100 Mbp abgeschätzt. Dies kommt einer ungefähren Anzahl an 100000 Genen gleich und entspricht in etwa der Anzahl an Genen im vorliegenden Ansatz. In der Literatur wurden auch BAC-Bibliotheken mit viel größeren Inserts und einer wesentlich größeren Anzahl an Klonen beschrieben. Béjà *et al.* (2000) beispielsweise konstruierten eine Metagenombank aus Pikoplankton mit 6240 Klonen und Insertgrößen zwischen 18 und 155 kb. Aus praktischen Gründen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine größere Anzahl an Klonen bereitgestellt werden. Werden die Klone nicht in Mikrotiterplatten aufbewahrt, kann eine wesentlich größere Anzahl an Klonen nach der gewünschten Aktivität durchsucht werden. Henne *et al.* (1999) untersuchten beispielsweise ca. 930000 Klone einer Metagenombank aus drei verschiedenen Böden direkt nach 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenaseaktivität, ohne die Klone in Mikrotiterplatten aufzubewahren. Für den hier verwendeten Ansatz war diese Methode ungeeignet, da das Screening nach glyphosatabbauenden rekombinanten *E. coli* nicht auf festem Medium erfolgen konnte.

Zudem kann die in dieser Arbeit erstellte Metagenombank auf lange Sicht noch weiteren Versuchen nach anderen Aktivitäten zur Verfügung stehen.

5.3.2 Diversität der Metagenombank

Ziel des Endsequenzierungsansatzes war es, genauere Informationen darüber zu erhalten, welche genomische Information in der Metagenombank gespeichert wurde und ihre Diversität zu evaluieren. Die Endsequenzierung zufällig ausgewählter Klone der Metagenombank ist aufgrund der hohen Gendichte von Prokaryonten viel versprechend. Mit einem ORF kann pro 1000 bp gerechnet werden (Tringe *et al.*, 2005). Der Großteil der Sequenzen dieser Arbeit (92,4 %) hatte eine Länge von 770 bp. Dies bedeutet, dass die individuellen Sequenzen den signifikanten Anteil mindestens eines Gens enthielten (Goo *et al.*, 2004).

Der G + C-Gehalt der 105 untersuchten Sequenzen wies eine Dominanz von Sequenzen mit einem relativ hohen G + C-Gehalt auf. 75,3 % der Sequenzen hatten dabei einen G + C-Anteil von über 55,1 %. Treusch *et al.* (2004) dokumentierten bei der Untersuchung einer wesentlich größeren Anzahl an Endsequenzen eine ähnliche Verteilung des G + C-Gehalts in einer von drei untersuchten Fosmid-Bibliotheken. Bei der entsprechenden Fosmid-Bibliothek aus dem Boden wurde bei der Zellyse wie auch in der vorliegenden Arbeit Lysozym zugesetzt. In beiden Bibliotheken führte dies zur Anhäufung von Organismen, deren Zellwand sensitiv gegenüber Lysozym reagierte.

Der Großteil der Sequenzen (57,1 %), die signifikante Ähnlichkeiten mit proteinkodierenden Genen aufwiesen, war bakteriellen Ursprungs. Der größte Anteil (46,7 %) zeigte dabei Ähnlichkeiten mit proteinkodierenden Genen gramnegativer Bakterien. Die Ursache für die nicht übereinstimmenden Ergebnisse des hohen G + C-Gehalts der meisten Sequenzen und dem Anteil an proteinkodierenden Genen von grampositiven Bakterien ist darin zu finden, dass sich der G + C-Gehalt auf die vollständigen Sequenzen bezog, die Ähnlichkeiten mit proteinkodierenden Genen sich dagegen häufig auf Sequenzabschnitte bezogen.

Im Endsequenzierungsansatz der vorliegenden Arbeit betrug der Anteil unbekannter Sequenzen 18,1 %. Während 38,1 % der Sequenzen unbekannt oder hypothetischen Funktionen zugewiesen wurden. Dieser hohe Prozentsatz ist dadurch bedingt, dass die öffentlichen Datenbanken keine nahen Verwandten der untersuchten Spezies, denen die Sequenzen zugrunde liegen, enthielten (Teeling *et al.*, 2004). In dem bisher größten

Sequenzierungsansatz eines Metagenomprojekts aus der Sargasso-See konnten 69 % der generierten Sequenzen keinen bekannten Funktionen zugeordnet werden (Venter *et al.*, 2004). Bisher wurden mehr als 300 bakterielle Genome vollständig sequenziert (Binnewies *et al.*, 2006). Der Großteil dieser Genome stammt dabei von medizinisch relevanten Bakterien. Diese Sequenzinformation ist auch in Anbetracht des hohen Anteils bislang nicht kultivierbarer Mikroorganismen im Boden relativ gering. Je mehr Genome aus solchen Habitaten rekonstruiert werden, umso mehr Gene können mit phylogenetischen Markern in Verbindung gebracht werden. Tyson *et al.* (2004) gelang es beispielsweise, zwei Genome (*Leptospirillum*; *Ferroplasma*) durch die Sequenzierung einer Metagenombank aus einem Biofilm fast vollständig zu rekonstruieren. Dies war möglich, weil die Biofilmgemeinschaft von wenigen bakteriellen Gattungen dominiert wurde. Für die wesentlich komplexeren bakteriellen Gemeinschaften aus dem Boden ist eine Rekonstruktion von Genomen mit einem vergleichbaren Datensatz kaum vorstellbar.

Der Vergleich der Sequenzen der vorliegenden Arbeit mit den Sequenzen öffentlicher Datenbanken zeigte, dass die genetische Information der Metagenombank aus dem Boden für eine Vielzahl an unterschiedlichen funktionellen Proteinen kodierte. Schmeisser *et al.* (2003) beschrieben ebenfalls eine große Anzahl funktioneller Klassen in ihrem Sequenzierungsansatz. In diesem Ansatz, in dem eine Cosmid-Bibliothek eines Biofilms untersucht wurde, stand allerdings ein größerer Datensatz als in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung.

Die Diversität möglicher proteinkodierender Gene, die durch die Zuordnung zu den verschiedenen COG-Kategorien reflektiert wurde, war mit der von drei komplett sequenzierten Genomen kultivierter Mikroorganismen (*Mesorhizobium loti*, *B. subtilis*, *Methanocaldococcus jannaschii*) vergleichbar. Geringfügige Abweichungen sind im relativ geringen Datensatz der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den sequenzierten Genomen begründet. Auch Treusch *et al.* (2004) konnten in ihrem Endsequenzierungsansatz vergleichbare Zuordnungen zu COG-Kategorien zwischen den von ihnen untersuchten Sequenzen und den Sequenzen derselben Referenzorganismen feststellen. Obwohl in diesem Ansatz ein größerer Datensatz als in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, traten auch geringe Abweichungen auf.

Obwohl die erhaltenen Sequenzen des Endsequenzierungsansatzes keine vollständige Analyse der physiologischen und metabolischen Funktionen der Metagenombank erlaubten, gewährten

sie dennoch einen Einblick in die genomische Struktur und das metabolische Potential der Metagenombank.

5.3.3 Phylogenetische Charakterisierung der Metagenombank

Um Aussagen über den phylogenetischen Ursprung der sich in der Metagenombank befindenden DNS treffen zu können, wurden die Sequenzen des Endsequenzierungsansatzes, die für phylogenetische Marker kodierten, ausgewertet. Neben t-RNS-Synthetasen und Elongationsfaktoren wurde ein partielles 23S-rRNS-Gen eines bisher nicht kultivierbaren Mikroorganismus detektiert. Der nächste Verwandte, der sich zuordnen ließ, hatte eine phylogenetische Ähnlichkeit von 96 % zu *Xanthomonas oryzae*. Das Screening der gesamten Metagenombank nach phylogenetischen Markern war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. In anderen Arbeiten (Béjà *et al.*, 2000; Liles *et al.*, 2003; Cottrell *et al.*, 2005) wurden bei der Durchsichtung von Metagenombanken zahlreiche 16S-rRNS-Gene gefunden, die eine breite Diversität an Mikroorganismen abdeckten. Pro bakteriellem Genom kann die Anzahl an rRNS-Operonen zwischen einem und 15 variieren (Rainey *et al.* 1996). Sporenbildende Bodenbakterien wie *Bacillus subtilis* (Loughney *et al.*, 1983) und *Clostridium paradoxum* (Rainey *et al.*, 1996) enthalten beispielsweise 10 – 15 Kopien von rRNS-Operonen pro Genom. Klappenbach *et al.* (2000) konnten in einem mit dem Herbizid 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) beaufschlagten Bodenmikrokosmos nachweisen, dass 2,4-D abbauende Bakterien mit multiplen ($\bar{x} = 5,4$) rRNS-Genen dominant wurden, während in den unbehandelten Kontrollen Populationen mit weniger rRNS-Operonen ($\bar{x} = 2,7$) dominierten. Unter der Annahme, dass ein durchschnittliches bakterielles Genom eine Größe von 4 Mb aufweist und zwischen einem und fünf rRNS-Operonen enthält, müsste die Metagenombank in dem hier untersuchten Ansatz zwischen 24 und 120 16S-rRNS-Gene enthalten. Rondon *et al.* (2000) hingegen konnten in ihrer SL1 Metagenombank aus dem Boden, die eine vergleichbare Größe zu der Metagenombank der vorliegenden Arbeit aufwies, nur sieben 16S-rRNS-Gene entdecken.

5.3.4 Auffinden eines Glyphosat abbauenden Klons in der Metagenombank

Zunächst wurden die 5079 Klone der Metagenombank in einem funktionellen Screening auf ihre Fähigkeit, Glyphosat als einzige P-Quelle zu nutzen, untersucht. Eine solche funktionelle Analyse hat das Potenzial, völlig neue Genklassen zu entdecken, die für neue Enzymtypen oder Enzymklassen kodieren. Der Vorteil eines funktionellen Screenings beruht darauf, dass

eine vorherige Kenntnis der Gensequenzen nicht erforderlich ist (Daniel, 2004) und dass nur aktive Enzyme detektiert werden (Lorenz *et al.*, 2002a). Von den 265 Klonen, die ein schwaches Wachstum zeigten, waren acht im INT-Test ebenfalls schwach positiv. Ein Grund für das schwache Wachstum der Klone im INT-Test kann eine andere Kodonverwendung von *E. coli* im Vergleich zu den Donor-Organismen sein (Streit und Schmitz, 2004). Zum Nachweis, dass diese Klone Glyphosat als einzige P-Quelle nutzten, waren weitere Versuche notwendig. Das Screening einer Metagenombank unter der Verwendung von INT wurde bislang nicht dokumentiert. Henne *et al.* (1999) konnten aber in ihrer Metagenombank durch die Verwendung von TTC, einem sehr ähnlichen künstlichen Elektronenakzeptor, fünf Klone nachweisen, die 4-Hydroxybutyrat abbauen konnten. Die Ursachen für eine fehlende heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* sind vielfältig. Zunächst müssen vollständige Gene und Operone in Verbindung mit nativen Promotoren und ribosomalen Bindungsstellen in der Metagenombank vorhanden sein und von *E. coli* erkannt werden (Daniel, 2004). Um eine heterologe Genexpression zu gewährleisten, müssen die rekombinanten Proteine korrekt gefaltet und prozessiert werden, wichtige Chaperone und Kofaktoren müssen vorhanden sein und die Sekretionsmaschinerie von *E. coli* muss die rekombinanten Proteine exportieren können (Gabor *et al.*, 2004b). Dies kann im Vorfeld eines Aktivitätsscreenings nicht vorausgesagt werden. Die Toxizität der rekombinanten Proteine kann als Ursache vernachlässigt werden, da pBeloBAC11 ein single-copy Plasmid ist (Liles *et al.*, 2003). In einer BAC-Bibliothek, die in *E. coli* mit genomischer DNS eines grampositiven Bakteriums (*Bacillus cereus*) konstruiert wurde, konnte eine heterologe Genexpression für sechs von zehn untersuchten Aktivitäten nachgewiesen werden (Rondon *et al.*, 1999). In Metagenombanken wurden bisher beispielsweise hämolytische Aktivitäten (Gillespie *et al.*, 2002), ein amylolytisches Enzym (Yun *et al.*, 2004), hydrolytische Enzyme (Ferrer *et al.*, 2005), Amidasen (Gabor *et al.*, 2004a), Chitinasen (Cottrell *et al.*, 1999) und β -Lactamasen (Song *et al.*, 2005) in Aktivitätsscreenings detektiert.

Da im kultivierungsabhängigen Ansatz vor allem grampositive Bakterienspezies nachgewiesen wurden, die Glyphosat als einzige P-Quelle nutzen konnten, wäre die Wahl eines grampositiven Klonierungswirtes unter Umständen sinnvoll gewesen.

Der Vorteil eines Screenings, das auf der DNS beruht, liegt darin, dass es nicht auf die heterologe Genexpression in *E. coli* angewiesen ist. Beispielsweise können in diesem Ansatz auch Klone gefunden werden, die im Aktivitätsscreening unentdeckt blieben, da in *E. coli*

das Expressionslevel den nötigen Schwellenwert nicht erreichte (Lorenz *et al.*, 2002a). Auch können partielle Gene detektiert werden. Für diesen Ansatz müssen Primer konstruiert werden, die konservierte Genregionen erkennen können. Diese werden entweder direkt in der PCR eingesetzt oder dienen dazu, Hybridisierungsproben zu erstellen. In diesem Ansatz bleibt allerdings offen, ob die Enzyme, für die die gefundenen Sequenzen kodieren, auch aktiv sind. Ein weiterer Nachteil des Screenings, das auf der DNS-Ebene beruht, besteht darin, dass keine völlig neuen Genklassen detektiert werden können. Dennoch ist die molekulare Diversität so groß, dass auch neue Varianten bekannter funktioneller Proteinklassen auf diese Weise identifiziert werden konnten (Lorenz *et al.*, 2002a). Für Xylanasen (Radomski *et al.*, 1988), Polyketidsynthasen (Seow *et al.*, 1997) und andere biotechnologisch relevante Enzymklassen (Lorenz *et al.*, 2002b) wurde dies bereits demonstriert. Die PCR-Primer wurden dabei von konservierten Regionen bekannter Gene abgeleitet. Die degenerierten Primer *phnJ1* und *phnJ2* der vorliegenden Arbeit wurden eingesetzt, um die 265 im Vorscreening ermittelten Klone der Metagenombank auf das Vorhandensein von *phnJ*-Genen und somit eines C-P-Lyaseoperons zu untersuchen. Von einem Klon (26A:F8) konnte ein PCR-Produkt der gewünschten Größe amplifiziert werden. Es konnte aber keine Ähnlichkeit zu bekannten *phnJ*-Genen festgestellt werden. Ob es sich bei diesem PCR-Produkt um ein unspezifisches Amplifikat handelte oder um eine bisher unbekannte Variante des *phnJ*-Gens, wurde in einem weiteren Versuch nach der Glyphosatabbaufähigkeit dieses Klons getestet. In der Glyphosatanalytik konnte dieser Klon die Glyphosatkonzentration im Versuchsverlauf nicht verringern. Er konnte somit Glyphosat nicht abbauen. Das Vorhandensein von *phnJ*-Genen in den restlichen Klonen der Metagenombank konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bearbeitet werden. In Metagenombanken konnten bislang durch Screenings, die auf der DNS-Ebene basierten, beispielsweise Dehydratasegene (Knietsch *et al.*, 2003) und Gene, die für Polyketidsynthasen (Seow *et al.*, 1997) kodierten, detektiert werden.

Von den acht im INT-Test schwach positiven Klonen, konnte ein Klon (17A:C5) im Versuchsverlauf die Glyphosatkonzentration im Vergleich zur Negativkontrolle verringern. Von diesem Klon konnte mittels PCR kein *phnJ*-Gen nachgewiesen werden. Da in den beiden bekannten Glyphosatabbauwegen C-P-Lyasen eine bedeutende Rolle spielen, ist es vorstellbar, dass dieser Klon einen bisher unbekanntem Weg des Glyphosatabbaus benutzt. Allerdings ist es auch möglich, dass ein *phnJ*-Gen in dem Klon 17A:C5 enthalten war, von dem Primerpaar *phnJ1* und *phnJ2* aber nicht erkannt wurde. Ein Grund hierfür kann sein, dass die verwendeten Primer nur teilweise gebunden haben oder zu spezifisch waren. Zum

endgültigen Nachweis der Glyphosatabbaufähigkeit des Klons 17A:C5 müsste ein Metabolit nachgewiesen werden. Die vollständige Sequenzierung dieses Klons kann Aufschluss über die zum Glyphosatabbau relevanten Gene liefern.

5.4 Genetisches Potenzial zum Glyphosatabbau in Bodenproben von A17 und NM

Phosphonate sind in der Umwelt allgegenwärtig. Neben natürlich vorkommenden Phosphonaten wie Phospholipidanaloga, Phosphonatantibiotika und 2-Aminoethylphosphonsäuren spielen synthetische Phosphonate vor allem in der Landwirtschaft in Form von Phosphonat-insektiziden und dem Herbizid Glyphosat eine bedeutende Rolle. Nur wenige Mikroorganismen können Phosphonate als einzige C- oder N-Quelle nutzen (Obojska, 1999). Zahlreiche Mikroorganismen hingegen verwenden Phosphonate meist unter Phosphatmangelbedingung als einzige P-Quelle zum Wachstum. Die C-P-Verbindung wird hierbei durch die Enzyme Phosphonoacetylhydrolase, Phosphonopyruvathydrolase, Phosphonatase und C-P-Lyase gespalten. Phosphonatasen und C-P-Lyasen sind dabei für den Abbau der meisten Phosphonate in der Natur verantwortlich (Kononova und Nesmeyanova, 2002). Viele Mikroorganismen, die aus den verschiedensten Umweltproben isoliert wurden, metabolisieren Phosphonate mit Hilfe der C-P-Lyase. Diese weist die Besonderheit auf, dass sie eine breite Substratspezifität besitzt (Dick und Quinn, 1995). Dies lässt auf die Bedeutung von Phosphonaten als potenzielle Nährstoffe schließen. Homologe Gene für den C-P-Lyase-abbauweg kommen dabei in entfernt verwandten Bakterienspezies vor (Huang *et al.*, 2005).

Zur Konstruktion der Primer *phnJoc1* und *phnJoc2* wurden die *phnJ*-Sequenzen der Isolate A17:32 und NM:5 (phylogenetische Ähnlichkeit mit *Paenibacillus* sp. und *Paenibacillus alginolyticus*), die sowohl bei den physiologischen als auch bei den genetischen Versuchen ein positives Ergebnis lieferten, und die in den öffentlichen Datenbanken zugänglichen *phnJ*-Sequenzen berücksichtigt (Engel, persönliche Mitteilung). Die öffentlichen Datenbanken enthielten dabei vor allem die Genomsequenzen von pathogenen Mikroorganismen und nur einige landwirtschaftlich oder ökologisch relevante Gruppen (Huang *et al.*, 2005). Bisher wurden in der Literatur ausschließlich Primer beschrieben, die für die Detektion der *phnJ*-Gene von *Sinorhizobium meliloti* (Parker *et al.*, 1999) und *Trichodesmium erythraeum* (Dyhrman *et al.*, 2006) konstruiert wurden (vgl. 4.2.1.2). Parker *et al.* (1999) gelang es mit dem von ihnen konstruierten Primerpaar das *phnJ*-Gen von *Sinorhizobium meliloti* nachzuweisen. Dyhrman *et al.* (2006) konnten mit dem von ihnen konstruierten Primerpaar neben dem *phnJ*-Gen von *Trichodesmium erythraeum* in drei weiteren *Trichodesmium*-

Spezies (*T. tenue*, *T. thiebautii*, *T. spiralis*) *phnJ*-Gene detektieren. Es bestand keine signifikante Ähnlichkeit zwischen den Primern dieser Arbeiten und den Primern in der vorliegenden Arbeit. Für die Konstruktion speziesspezifischer Primer stehen deutlich mehr konservierte Bereiche zur Verfügung als für die Konstruktion der Primer der vorliegenden Arbeit, die *phnJ*-Sequenzen verschiedener phylogenetisch entfernt verwandter Organismen nachweisen sollten.

Mit dem Primerpaar *phnJoc1/phnJoc2* konnten in beiden Böden (schluffiger Boden A17 und sandiger Boden NM) und bei beiden Behandlungsformen (mit/ohne Glyphosat-beaufschlagung) *phnJ*-Genfragmente diverser Mikroorganismen detektiert werden. Die Auswertung der Klongenbanken wies interessanterweise ausschließlich *PhnJ*-Sequenzen nach, die Ähnlichkeiten mit *PhnJ*-Sequenzen von α -Proteobakterien hatten. Dies ist nicht durch die Primer selbst bedingt, da in der virtuellen PCR auch *phnJ*-Gene von β -, γ - und δ -Proteobakterien, einem Cyanobakterium und einem grampositiven Bakterium nachgewiesen werden konnten. Dies wurde auch in *in vitro* PCR bestätigt, in der mit dem Primerpaar *phnJoc1/phnJoc2* *phnJ*-Sequenzen von grampositiven Bakterien (*Oceanobacillus iheyensis*; *Paenibacillus* sp., *P. alginolyticus*) detektiert werden konnten. Da es sich bei den beiden *Paenibacillus*-Spezies um Isolate aus A17 und NM handelte, müssen die *phnJ*-Gene dieser Isolate in beiden Böden vorhanden sein. Gründe für einen fehlenden Nachweis dieser *phnJ*-Gene in der PCR können einerseits dadurch bedingt sein, dass die grampositiven Bakterien bei der DNS-Isolierung nicht lysiert wurden, andererseits kann auch ihre Anzahl im Boden so gering sein, dass sie unter der Nachweisgrenze liegen. Auch gehören *Paenibacilli* zu den R-Strategen, die sich leicht kultivieren lassen, da sie sich unter günstigen Nährstoffverhältnissen, wie dies bei dem hier verwendeten MOPS-Medium möglich wäre, schnell vermehren können. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass sie bei der Isolierung überrepräsentiert waren. Je nach Standort schwankte der Anteil an Sequenzen, die nicht für C-P-Lyasen kodierte, zwischen 32,5 % und 65 %. Der hohe Anteil lässt sich dadurch erklären, dass der Primer *phnJoc1* zweimal gebunden hat. Diese Amplifikate ließen sich nicht anhand ihrer Größe von den Amplifikaten der *phnJ*-Gene unterscheiden.

An einem Standort und unter einer Behandlungsform (schluffiger Boden A17 + Gly) wurde die bakterielle Diversität der nachweisbaren *phnJ*-Gene und *PhnJ*-Sequenzen komplett erfasst. Im Vergleich zu den *PhnJ*-Sequenzen desselben Standortes ohne Glyphosatapplikation wurde durch den Zusatz von Glyphosat am Standort A17 die Diversität herabgesetzt. Dies kann

dadurch bedingt sein, dass bestimmte Mikroorganismen durch den Zusatz von Glyphosat in ihrem Wachstum stimuliert wurden und die Population anschließend dominierten. Seghers *et al.* (2001) konnten ebenfalls nach einer Herbizidbehandlung eine herabgesetzte Diversität von Typ I Methanotrophen nachweisen. Chang *et al.* (2001) untersuchten *amoA* Klonbibliotheken, die nach der Behandlung mit fünf Herbiziden (Atrazin, Dicamba, Fluometuron, Metachlor und Sulfentrazon) erstellt wurden. Während die unbehandelte Kontrolle stabile Populationsgrößen aufwies, konnte nach dem Herbizidzusatz von 100 ppm eine signifikante Populationsabnahme beobachtet werden. Da der Standort A17 in der Vergangenheit bereits mehrfach mit Glyphosat behandelt wurde, sind die Mikroorganismen bereits gut an den Abbau von Glyphosat adaptiert. Der sandige Boden des Standortes NM wies im Vergleich zum schluffigen Boden des Standortes A17 eine größere Diversität an *phnJ*-Sequenzen auf. Über die Auswirkungen der Applikation von Glyphosat auf die Diversität der *phnJ*-Sequenzen an diesem Standort (NM) können erst gesicherte Aussagen getroffen werden, wenn eine größere Anzahl an *phnJ*-Sequenzen zur Verfügung steht.

Alle in der vorliegenden Arbeit detektierten PhnJ-Sequenzen konnten in einer phylogenetischen Analyse zwei Gruppen zugeordnet werden. Gruppe A enthielt PhnJ-Sequenzen verschiedener bakterieller Linien, während in der größeren Gruppe B PhnJ-Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu den PhnJ-Sequenzen von drei α -Proteobakterien eingeschlossen waren. Eine Gruppierung der Sequenzen nach Standort und Behandlungsform wurde dabei nicht beobachtet. In einer phylogenetischen Analyse aller in öffentlichen Datenbanken zugänglichen PhnJ-Sequenzen konnten Dyhrman *et al.* (2006) hingegen drei Hauptgruppen identifizieren. Eine Gruppe enthielt PhnJ-Sequenzen von γ -Proteobakterien, eine Gruppe bestand ausschließlich aus PhnJ-Sequenzen von α -Proteobakterien und die dritte Gruppe enthielt PhnJ-Sequenzen verschiedener bakterieller Linien. Im Gegensatz zu den PhnJ-Sequenzen der vorliegenden Arbeit, die durch Umschreiben der in der PCR detektierten *phnJ*-Genfragmente entstanden, untersuchten Dyhrman *et al.* (2006) vollständige PhnJ-Sequenzen.

Der Großteil der in den beiden Böden detektierten PhnJ-Fragmente wies Ähnlichkeiten mit der PhnJ-Sequenz von *Rhodopseudomonas palustris* auf. Im Isolierungsansatz konnte hingegen kein *Rhodopseudomonas palustris* nachgewiesen werden. Dies ist auf die verwendete Isolierungsmethode und das eingesetzte Medium zurückzuführen.

Viele *phn*-Operons befinden sich in der Nähe von mobilen genetischen Elementen wie

Transposasen (Huang, 2005). Für das *phn*-Operon von *Trichodesmium erythraeum* gibt es Beweise, dass es durch horizontalen Gentransfer erworben wurde (Dyhrman *et al.*, 2006). *T. erythraeum* ist bisher das einzige marine Cyanobakterium, das Gene für einen C-P-Lyaseweg enthält und sich dadurch wahrscheinlich einen Wettbewerbsvorteil sichert. Lateraler Gentransfer dürfte auch im Boden eine wichtige Rolle spielen, da durch die Fähigkeit des Phosphonatabbaus das Überlebenspotential von Mikroorganismen erhöht wird. Für A17 und NM wurde das Vorhandensein von *phnJ*-Genen nachgewiesen. Es ist davon auszugehen, dass diese Gene auch tatsächlich exprimiert werden. Dies müsste experimentell bestätigt werden, wie dies für die Expression des *phnJ*-Gens in *T. erythraeum* unter Phosphatmangelbedingungen bereits erfolgte (Dyhrman *et al.*, 2006). Durch reverse Transkription der m-RNS und anschließende PCR konnte nur in *T. erythraeum*-Kulturen, die unter Phosphatmangelbedingungen angezogen wurden, die Expression des *phnJ*-Gens nachgewiesen werden.

5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Abbauraten von Glyphosat in Böden variieren erheblich, deshalb kann die Akkumulation von Glyphosat nach wiederholter Applikation nicht ausgeschlossen werden. Dies unterstreicht die Bedeutung, die Mechanismen des Glyphosatabbaus im Boden näher zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass mit kultivierungsabhängigen Methoden Mikroorganismen, die Glyphosat als einzige Phosphatquelle nutzten, aus verschiedenen Böden isoliert werden konnten. Unter den gewählten Versuchsbedingungen wurden in diesem kultivierungsabhängigen Ansatz vor allem grampositive Bakterien isoliert. Der kultivierungsunabhängige Ansatz hingegen lieferte einen viel versprechenden Kandidaten, der zum Abbau von Glyphosat befähigt zu sein schien. In diesem kultivierungsunabhängigen Ansatz wurde in einer zeit- und arbeitsintensiven Methode eine Metagenombank erstellt. Diese kann zukünftig nach weiteren Mechanismen des Glyphosatabbaus und beliebigen weiteren mikrobiellen Funktionen durchsucht werden. Das Vorhandensein von C-P-Lyaseoperonen konnte durch den Nachweis von *phnJ*-Genen diverser Mikroorganismen in den untersuchten Böden erbracht werden. Hierbei zeigte sich, dass in dem schluffigen Boden (A17) die Applikation von Glyphosat zu einer Reduzierung der Diversität der nachweisbaren *phnJ*-Gene führte. Die ausschließliche Identifizierung von *PhnJ*-Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu *PhnJ*-Sequenzen von α -Proteobakterien, lässt vermuten, dass α -Proteobakterien eine besondere Rolle im Abbau von Glyphosat und anderer Phosphonate im Boden spielen. Das Ergebnis kann dazu anregen, α -Proteobakterien verstärkt auf ihre Glyphosat- und Phosphonatabbaufähigkeit zu untersuchen. Die Funktionalität der *phnJ*-Gene müsste durch Expressionsversuche bestätigt

werden. Die Ergebnisse zeigen, dass nur die Kombination kultivierungsabhängiger und kultivierungsunabhängiger Methoden zu einem umfassenden Verständnis über die Auswirkungen von Pestiziden führen kann.

Die breite Substratspezifität wurde für den C-P-Lyaseabbauweg beschrieben. Zahlreiche Mikroorganismen konnten neben Glyphosat eine beträchtliche Anzahl weiterer Phosphonate als einzige P-Quelle nutzen (Quinn *et al.*, 1989; Konanova und Nesmeranova, 2002; Schowanek und Verstraete, 1990). Dennoch kann von dem Vorhandensein von C-P-Lyase kodierenden Genen nicht unmittelbar auf die Fähigkeit zum Glyphosatabbau geschlossen werden. *E. coli* beispielsweise besitzt ein *phn*-Operon, kann Glyphosat aber nicht als P-Quelle nutzen (Kononova und Nesmeyanova, 2002). Hierbei wird davon ausgegangen, dass es sich um ein Transportproblem handelt. Eine genauere Untersuchung der für den Phosphonattransport verantwortlichen Gene in verschiedenen Mikroorganismen könnte dazu beitragen, C-P-Lyasegene zu detektieren, die glyphosatspezifisch sind. Die Kristallisation der C-P-Lyase könnte Aufschluss über ihre Substratbindungsstellen geben.

Auf lange Sicht könnten diese glyphosatspezifischen C-P-Lyasegene dazu genutzt werden, in biotechnologischen „on-site“-Verfahren eingesetzt zu werden. An Standorten, an denen sich Glyphosat akkumuliert und nur sehr langsam abgebaut wird, könnte durch gezielte Bioremediation der Glyphosatabbau beschleunigt werden. Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die Bioverfügbarkeit von Glyphosat in dem entsprechenden Boden gegeben ist. Ein besseres Verständnis über den Abbau von Pestiziden im Boden ist unentbehrlich, um Kontaminationen, die durch Pestizide verursacht werden, zu reduzieren.

6. Zusammenfassung

Mit dem Aufkommen von herbizidresistenten Pflanzen werden einige Herbizide besonders häufig eingesetzt werden. Deren Abbau muss verstanden werden, um ihn unterstützen zu können. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Verständnis über den Abbau des Herbizids Glyphosat im Boden zu erweitern, C-P-Lyase kodierende Gene nachzuweisen und ihre Diversität und ihre Beeinflussung durch Glyphosat darzustellen. Im Mikrokosmenexperiment wurde mit zwei unterschiedlichen agrarischen Bodenmaterialien (schluffig bzw. sandig) der kurzfristige Einfluss der Applikation von Glyphosat auf die Bodenmikroflora bestimmt. Im sandigen Oberboden bewirkte die Aufbringung von Glyphosat einen Anstieg der CO₂- und der N₂O-Produktion. In einem kultivierungsabhängigen Ansatz konnten von beiden Standorten insgesamt vier Bakterienspezies (phylogenetische Ähnlichkeiten mit *Paenibacillus* sp.; *P. alginolyticus*; *Rhodococcus* sp.; *Burkholderia hospita*) isoliert werden, die Glyphosat als einzige P-Quelle nutzen konnten. In den beiden Isolaten, die eine phylogenetische Ähnlichkeit mit *Paenibacillus* aufwiesen, konnte das Vorhandensein eines C-P-Lyaseoperons durch den Nachweis des *phnJ*-Gens erbracht werden. Dies gibt Hinweise darauf, dass in diesen beiden Isolaten Glyphosat und andere Phosphonate über den C-P-Lyaseweg abgebaut werden. In den anderen beiden Isolaten (phylogenetische Ähnlichkeiten mit *Rhodococcus* sp.; *Burkholderia hospita*) konnte kein C-P-Lyaseoperon detektiert werden. Diese beiden Bodenisolate enthalten entweder ein *phnJ*-Gen, das mit dem entwickelten Primerpaar nicht detektiert wird, oder sie bauen Glyphosat und andere Phosphonate nicht über den C-P-Lyaseweg, sondern über einen anderen biochemischen Weg ab. In einem kultivierungsunabhängigen Ansatz wurde eine Metagenombank aus dem sandigen Boden NM bestehend aus 5079 Klonen mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 18,6 kb erstellt. Insgesamt wurden 94,4 Mbp an DNS in dieser Bibliothek zusammengestellt. Die Endsequenzierung von ca. 2,0 % der Klone ergab, dass eine große Anzahl funktioneller Klassen und eine große Diversität proteinkodierender Gene in der Metagenombank enthalten war. Zudem wurde in diesem Ansatz ein partielles 23S-rRNS-Gen eines bisher nicht kultivierten Bakteriums detektiert. In dem funktionellen Screening der Metagenombank wurde ein viel versprechender Klon (17A:C5) festgestellt, der im Vergleich zur Negativkontrolle die Glyphosatkonzentration verringern konnte. Ein C-P-Lyaseoperon konnte in diesem Klon nicht nachgewiesen werden. Das *phnJ*-Gen wurde in diesem Klon mit dem entwickelten Primerpaar entweder nicht erkannt oder der Abbau von Glyphosat erfolgte nicht über den C-P-Lyaseweg. Die noch ausstehende vollständige Sequenzierung dieses Klons und der

Nachweis von Metaboliten werden zur Klärung der offenen Fragen beitragen. In beiden untersuchten Böden konnten mit und ohne Glyphosatapplikation *phnJ*-Gene detektiert werden, die interessanterweise alle Ähnlichkeiten mit *phnJ*-Genen von α -Proteobakterien aufwiesen. In dem schluffigen Boden A17 wurde dabei die komplette bakterielle Diversität der *phnJ*-Gene erfasst. Durch die Applikation von Glyphosat wurde die Diversität der *phnJ*-Gene herabgesetzt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination kultivierungsabhängiger und kultivierungsunabhängiger Methoden Nachteile der jeweiligen Methoden umgangen werden können. Es wurden Gene identifiziert, die beim Glyphosat- bzw. Phosphonatabbau im Boden eine wichtige Rolle spielen. Damit wurden die ersten Schritte für eine Bioremediation dieser Xenobiotika geschaffen. Weiterführende Untersuchungen werden nötig sein, bis ein ausgereiftes biotechnologisches „on-site“-Verfahren entwickelt ist. Mit diesem Verfahren wird es möglich sein, in Böden, die sehr lange Halbwertszeiten beim Abbau von Glyphosat und anderer Phosphonate aufweisen, den Xenobiotikabbau zu beschleunigen.

7. Literaturverzeichnis

- Ackermann, G., Y. J., Tang, R., Kueper, P., Heisig, A. C., Rodloff, J., Silva Jr. Und S. H. Cohen (2001), Resistance to Moxifloxacin in toxigenic *Clostridium difficile* isolates is associated with mutations in *gyrA*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2348-2353
- Altschul, S. F., T. L., Madden, A. A., Schäffer, J., Zhang, Z., Zhang, W., Miller und D. J. Lipman (1997), Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402
- Amann, R. L., W., Ludwig und K. H. Schleifer (1995), Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual cells without cultivation, *Microbiological Reviews* 59, 143-169
- Balthazor, T. M. und L. E. Hallas (1986), Glyphosate degrading microorganisms from industrial activated sludge, *Applied and Environmental Microbiology* 51, 432-434
- Béjà, O., M. T., Suzuki, E. V., Koonin, L., Aravind, A., Hadd, L. P., Nguyen, R., Villacorta, M., Amjadi, C., Garrigues, S. B., Jovanovich, R. A., Feldman und E. DeLong (2000), Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage, *Environmental Microbiology* 2, 516-529
- Binnewies, T. T., Y., Motro, P. F., Hallin, O., Lund, D., Dunn, T., La, D. J., Hampson, M., Bellgard, T. M., Wassenaar und D. W. Ussery (2006), Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries, *Functional and Integrative Genomics* 6, 165-185
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1516
- Bruns, A., H., Cypionka und J. Overmann (2002), Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea, *Applied Environmental Microbiology* 68, 3978-3987
- Bujacz, B., P., Wieczorek, T., Krzysko-Lupika, Z., Golab, B., Lejczak und P. Kafarski (1995), Organophosphonate utilization by the wild-type strain of *Penicillium notatum*, *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2905-2910
- Bult, C. J., O., White, G. J., Olsen, L., Zhou, R. D., Fleischmann, G. G., Sutton, J. A., Blake, L. M., Fitzgerald, R. A., Clayton, J. D., Gocayne, A. R., Kerlavage, B. A., Dougherty, J. F., Tomb, M. D., Adams, C. I., Reich, R., Overbeek, E. F., Kirkness, K. G., Weinstock, J. M., Merrick, A., Glodek, J. L., Scott, N. S., Geoghagen und J. C. Venter (1996), Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*, *Science* 273, 1058-1073

- Busse, M. D., A. W., Ratcliff, C. J., Shestak und R. F. Powers** (2001), Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities, *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1777-1789
- Carson, D. B., M. A., Heitkamp und L. E. Hallas** (1997), Biodegradation of N-Phosphonomethyliminodiacetic acid by microorganisms from industrial activated sludge, *Canadian Journal of Microbiology* 43, 97-101
- Cassman, K. G., D. N., Munns und D. P. Beck** (1981), Growth of *Rhizobium* strains at low concentrations of phosphate, *Soil Science Society of America Journal* 45, 520-523
- Cerdeira, A. L. und S. O. Duke** (2006), The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: A review, *Journal of Environmental Quality* 35, 1633-1658
- Chang, Y. J., A. K., Hussain, J. R., Stephen, M. D., Mullen, D. C., White und A. Peacock** (2001), Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous beta-subgroup ammonia-oxidizer communities in soil microcosms, *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2462-2468
- Coleman, B. und B. M. Jenks** (1999), North Dakota Roundup Ultra Section 18, North Dakota Department of Agriculture
- Cottrell, M. T., J. A., Moore und D. L. Kirchman** (1999), Chitinases from uncultured marine microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2553-2557
- Cottrell, M. T., L. A., Waidner, L., Yu und D. L. Kirchman** (2005), Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from the Delaware River, *Environmental Microbiology* 7, 1883-1895
- Crawford, J. J., G. K., Sims, R. L., Mulvaney und M. Radosevich** (1998), Biodegradation of atrazine under denitrifying conditions, *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 618-623
- Cullen, D. W. und P. R. Hirsch** (1998), Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR, *Soil Biology and Biochemistry* 30, 983-939
- Daniel, R.** (2004), The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products, *Current Opinion in Biotechnology* 15, 199-204
- Daniel, R.** (2005), The metagenomics of soil, *Nature Reviews Microbiology* 3, 470-478
- Delannay, X., T. T., Baumann und D. H. Beighley** (1995), Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean line after treatment with glyphosate, *Crop Science* 35, 1461-1467
- DeLong** (2005), Microbial community genomics in the ocean, *Nature Reviews Microbiology* 3, 459-469

- Diaz-Torres, M. L., R., McNab, D. A., Spratt, A., Villedieu, N., Hunt, M., Wilson und P. Mullany** (2003), Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 1430-1432
- Dick, R. E. und J. P. Quinn** (1995), Control of glyphosate uptake and metabolism in *Pseudomonas* sp. 4ASW, *FEMS Microbiology Letters* 134, 177-182
- Dörfler, U., R., Schroll, I., Scheunert und D. Klotz** (1994), Aufklärung der Vorgänge, die zum Eintrag von Pflanzenschutzmitteln in das Grundwasser führen, das für die Trinkwasserversorgung genutzt wird, *GSF-Bericht* 19/94, 17
- Don, R. H., P. T., Cox, B. J., Wainwright, K., Baker und J. S. Mattick** (1991), "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification, *Nucleic Acids Research* 19, 4008
- Doolittle, R. F.** (2002), Biodiversity: microbial genomes multiply, *Nature* 416, 697-700
- Dumont, M. G. und J. C., Murrell** (2005), Stable isotope probing – linking microbial identity to function, *Nature Reviews Microbiology* 3, 499-504
- Dunn, J. J. und F. W. Studier** (1983), Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements, *Journal of Molecular Biology* 166,477-535
- Dyhrman, S. T., P. D., Chappell, S. T., Haley, J. W., Moffett, E. D. Orchard, J. B., Waterbury und E. A. Webb** (2006), Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*, *Nature* 439, 68-71
- El Sebai, T., B., Lagacherie, G., Soulas und F. Martin-Laurent** (2004), Isolation and characterisation of an isoproturon-mineralising *Methylophila* sp. TES from French agricultural soil, *FEMS Microbiological Letters* 239, 103-110
- Enrich-Prast, A.** (2006), Effect of pesticides on nitrification in aquatic sediment, *Brazilian Journal of Biology* 66, 405-412
- Eschenfeldt, W. H., L., Stols, H., Rosenbaum, Z. S., Khambatta, E., Quate-Randall, S. Wu, D. C., Kilgore, J. D., Trent, und M. I. Donnelly** (2001), DNA from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductases, *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4206-4214
- Fan, X. H. und T. Haruo** (2004), N₂O emissions from a cultivated andisol after application of nitrogen fertilizers with or without nitrification inhibitor under soil moisture regime, *Journal of Environmental Sciences (China)* 16, 735-737
- Felsenstein, J.** (1989), PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2), *Cladistics* 5, 164-166
- Felsenstein, J.** (1993), PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c, Vertrieb durch

- den Autor, Department of Genetics, University of Washington, Seattle
- Ferrer, M., O. V., Golyshina, T., N., Chernikova, A. N., Khachane, D., Reyes-Duarte, V. A. P. M., Dos Santos, C., Strompl, K., Elborough, G., Jarvis, A., Neef, M. M., Yakimov, K. N., Timmis und P. N. Golyshin** (2005), Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora, *Environmental Microbiology* 7, 1996-2010
- Flessa, H., R., Ruser, R. Schilling, N., Lotfield, J. C., Munch, E. A., Kaiser und F. Beese** (2002), N₂O und CH₄ fluxes in potato fields: automated measurement, management effects and temporal variation, *Geoderma* 105, 307-325
- Gabor, E. M., E. J., de Vries und D. B. Janssen** (2003), Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods, *FEMS Microbiology Ecology* 44, 153-163
- Gabor, E. M., E. J., de Vries und D. B. Janssen** (2004a), Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases, *Environmental Microbiology* 6, 948-958
- Gabor, E. M., W. B. L., Alkema und D. B. Janssen** (2004b), Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques, *Environmental Microbiology* 6, 879-886
- Garbi, C., L., Casaus, R., Martinez-Alvarez, J., Ignacio-Robla und M. Martin** (2006), Biodegradation of oxadiazon by a soil isolated *Pseudomonas fluorescens* strain CG5: implementation in an herbicide removal reactor and modelling, *Water Research* 40, 1217-1223
- Gerritse, R. G., J., Beltran und F. Hernandez** (1996), Adsorption of atrazine, simazine und glyphosate in soils of the Gnangara Mound, Western Australia, *Australian Journal of Soil Research* 34, 599-607
- Getenga, Z. M. und F. O. Kengara** (2004), Mineralization of glyphosate in compost-amended soil under controlled conditions, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72, 266-275
- Gianessi, L. P. und N. Reigner** (2006), Pesticide use in U. S. crop protection: 2002, Crop Life Foundation, Washington, D. C.
- Gillespie, D. E., S. F., Brady, A. D., Bettermann, N. P., Cianciotto, M. R., Liles, M. R., Rondon, J., Clardy, R. M., Goodman und J. Handelsman** (2002), Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA, *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4301-4306

- Gimsing, A. L. und O. K. Borggaard** (2002), Competitive adsorption and desorption of glyphosate on clay silicates and oxides, *Clay Minerals* 37, 509-515
- Ginolhac, A., C., Jarrin, B., Gillet, P., Robe, P., Pujic, K., Tuphile, H., Bertrand, T. M., Vogel, G., Perrière, P., Simonet und R. Nalin** (2004), Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones, *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5522-5527
- Goo, Y. A., J., Roach, G., Glusman, N. S., Baliga, K., Deutsch, M. Pan, S., Kennedy, S. DasSarma, W. V., Ng und L. Hood** (2004), Low-pass sequencing for microbial comparative genomics, *BMC Genomics* 5, 3-21
- Green, E. D., H. C., Riethman, J. E., Dutchik und M. V. Olson** (1991), Detection and characterisation of chimeric yeast artificial chromosome clones, *Genomics* 11, 658-669
- Guardabassi, L. und Y. Agero** (2006), Genes homologous to glycopeptide resistance *vanA* are widespread in soil microbial communities, *FEMS Microbiological Letters* 259, 221-225
- Handelsman, J., M. R., Rondon, S. F., Brady, J., Clardy und R. M. Goddman** (1998), Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products, *Chemistry & Biology* 5, R245-R249
- Handelsman, J.** (2004), Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 669-685
- Haney, R. L., S. A., Senseman, F. M., Hons und D. A. Zuberer** (2000), Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass, *Weed Science* 48, 89-93
- Hantschel, R. E., H., Flessa, und F. Beese** (1994), An automated microcosm system for studying soil ecological processes, *Soil Science Society of America Journal* 58, 401-404
- Hassal, K. A** (1990), The Biochemistry and uses of pesticides – structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection, 2. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Henne, A., R., Daniel, R. A. Schmitz und G. Gottschalk** (1999), Construction of Environmental libraries in *E. coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-Hydroxybutyrat, *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3901-3907
- Henne, A., R. A., Schmitz, M., Bömeke, G., Gottschalk und R. Daniel** (2000), Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3113-3116
- Heukeshoven, J. und R. Dernik** (1986), Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung, Radda, B. J. (Hrsg.), Elektrophoreseforum 1986, Technische Universität München, München, 22-27
- Higgins, D. G., A. J., Blesby und R. Fuchs** (1992), CLUSTAL V: Improved software for

- multiple sequence alignment, *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)* 8, 189-191
- Hilderbrand, R. L.** (1983) Vorwort, In: Hilderbrand, R. L. (Herausgeber), *The role of phosphonates in living systems*, CRC Press, Boca Raton, Florida (USA), 2-3
- Huang, J., Z. Su und Y. Xu** (2005), The evolution of microbial phosphonate degradative pathways, *Journal of Molecular Evolution* 61, 682-690
- Hurtig, A. K., M., San Sebastian, A., Soto, A., Shingre, D., Zambrano und W. Guerrero** (2003), Pesticide use among farmers in the Amazon basin of Ecuador, *Archives of Environmental Health* 58, 223-228
- ISAAA** (2003), International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Press Release, [WWW document], http://www.isaaa.org/Press_release/GMUpdate2002.htm
- IUB** (1985), Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984., *Biochemical Journal* 229, 281-286
- Janssen, P. H., P. S., Yates, B. E., Grinton, P. M. Taylor und M. Sait** (2002), Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actionbacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*, *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2391-2396
- Johnson, W. G., P. R., Bradley und S. E. Hart** (1998), Weed management in glyphosate and glufosinate-tolerant corn, *Weed Science Society of America Abstract* 38, 5
- Juretschko, S., G., Timmermann, M., Schmid, K.-H., Schleifer, A., Pommerening-Röser, H.-P., Koops und M. Wagner** (1998), Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations, *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3042-3051
- Kaeberlein, T., K., Lewis und S. S. Epstein** (2002), Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment, *Science* 296, 1127-1129
- Kafarski, P., B., Lejczak und G. Forlani** (2001), Biodegradation of pesticides containing carbon-to-phosphorus bond, *ACS Symposium Series* 777, 145-163
- Kamp, T., H., Steindl, U., Wild, J., Pfadenhauer und J. C. Munch** (1998), Flussraten der klimarelevanten Spurengase N₂O, CH₄ und CO₂ während der Renaturierung eines degradierten Niedermoorstandortes, *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* 88, 23-26
- Kaneko, T., Y., Nakamura, S., Sato, E., Asamizu, T., Kato, S., Sasamoto, A., Watanabe, K., Idesawa, A., Ishikawa, Kawashima, T., Kimura, Y., Kishida, C., Kiyokawa, M.,**

- Kohara, M., Matsumoto, A., Matsuno, Y., Mochizuki, S., Nakayama, N., Nakazaki, S., Shimpo, M., Sugimoto, C., Takeuchi, M., Yamada und S. Tabata** (2000), Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*, *DNA Research* 7, 331-338
- Keeling, W., P. A., Dotray, C. L., Jones und S. L. Sunderland** (1996), Postemergence weed management in Roundup Ready™ cotton for the Texas southern high plains, *Proceedings. Southern Weed Science Society* 49, 52-53
- Kertesz, M., A., Elgorriaga und N. Amrhein** (1991), Evidence for two distinct phosphonate-degrading enzymes (C-P-Lyases) in *Arthrobacter* sp. GLP-1, *Biodegradation* 2, 53-59
- Kertesz, M. A., A. M., Cook und T. Leisinger** (1994), Microbial metabolism of sulfur- and phosphorus- containing xenobiotics, *FEMS Microbiology Reviews* 15, 195-215
- Kim, U. J., B. W., Birren, T., Slepak, V., Mancino, C., Boysen, H. L., Kang, M. I., Simon und H., Shizuya** (1996), Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library, *Genomics* 34, 213-218
- Kinney, C., K. W., Mandernack und A. R. Mosier** (2005), Laboratory investigations into the effects of the pesticides mancozeb, chlorothalonil, and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil, *Soil Biology and Biochemistry* 37, 837-850
- Kishore, G. M. und G. S. Jacob** (1987), Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate, *Journal of Biological Chemistry* 262, 12164-12167
- Klappenbach, J. A., J. M., Dunbar und T. M. Schmidt** (2000), rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria, *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1328-1333
- Klimek, M., B., Lejczak, P., Kafarski und G. Forlani** (2001), Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate-utilizing strain of *Penicillium chrysogenum*, *Pest Management Science* 57, 815-821
- Knietsch, A., S., Bowien, G., Whited, G., Gottschalk und R. Daniel** (2003), Identification and characterization of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydrate encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures, *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3048-3060
- Kononova, S. V. und M. A. Nesmeyanova** (2002), Phosphonates and their degradation by microorganisms, *Biochemistry (Moscow)* 67, 184-195
- Krsek, M. und E. M. H. Wellington** (1999), Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil, *Journal of Microbiological*

Methods 39, 1-16

- Krzysko-Lupicka, T., W., Strof, K., Kubs, M., Skorupa, P., Wieczorek, B., Lejczak und P. Kafarski (1997), The ability of soil-borne fungi to degrade organophosphonate carbon-to-phosphorus bonds, *Applied Microbiology and Biotechnology* 48, 549-552
- Kuklinsky-Sobral, H. L., W. L., Araujo, R., Mendes, A. A., Pizzirani-Kleiner und J. L. Azevedo (2005), Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glyzine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide, *Plant and Soil* 273, 91-99
- Kulakova, A. N., L. A., Kulakov und J. P. Quinn (1997), Cloning of the phosphonoacetate hydrolase gene from *Pseudomonas fluorescens* 23F encoding a new type of carbon-phosphorus bond cleaving enzyme and its expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*, *Gene* 195, 49-53
- Kunst, F., N., Ogasawara, I., Moszer, A. M., Albertini, G., Alloni, V., Azevedo, M. G., Bertero, P., Bessieres, A., Bolotin, S., Borchert, R., Borriss, L., Boursier, A., Brans, M., Braun, S. C., Brignell, S., Bron, S., Brouillet, C. V., Bruschi, B., Caldwell, V., Capuano, N. M., Carter, S.-K., Choi, J.-J., Codani, I. F., Connerton, N. J., Cummings, R. A., Daniel, F., Denizot, K. M., Devine, A., Düsterhöft, S. D., Ehrlich, P. T., Emmerson, K. D., Entian, J., Errington, C., Fabret, E., Ferrari, D., Foulger, C., Fritz, M., Fujita, Y., Fujita, S., Fuma, A., Galizzi, N., Galleron, S.-Y., Ghim, P., Glaser, A., Goffeau, E. J., Golightly, G., Grandi, G., Giuseppe, B. J., Guy, K., Haga, J., Haiech, C. R., Harwood, A., Hénaut, H., Hilbert, S., Holsappel, S., Hosono, M.-F., Hullo, M., Itaya, L., Jones, B., Joris, D., Karamata, Y., Kobayashi, P., Koetter, G., Koningstein, S., Krogh, M., Kumano, K., Kurita, A., Lapidus, S., Lardinois, J., Lauber, V., Lazarevic, S.-M., Lee, A., Levine, H., Liu, S., Masuda, C., Mauel, C., Médigue, N., Medina, R. P., Mellado, M., Mizuno, D., Moestl, S., Nakai, M., Noback, D., Noone, M., O'Reilly, K., Ogawa, A., Ogiwara, B., Oudega, S.-H., Park, V., Parro, T. M., Pohl, D., Portetelle, S., Porwollik, A. M., Prescott, E., Prescan, P., Pujic, B., Purnelle, G., Rapaport, M., Rey, S., Reynolds, M., Rieger, C., Rivolta, E., Rocha, B., Roche, M., Rose, Y., Sadaie, T., Sato, E., Scanlan, S., Schleich, R., Schroeter, F., Scoffone, J., Sekiguchi, A., Sekowska, S. J., Seror, P., Serror, B.-S., Shin, B., Soldo, A., Sorokin, E., Tacconi, T., Takagi, H., Takahashi, K., Takemaru, M., Takeuchi, A., Tamakoshi, T., Tanaka, P., Terpstra, A., Togoni, V., Tosato, S., Uchiyama, M., Vandenbol, F., Vannier, A., Vassarotti, A., Viari, R., Wambutt, E., Wedler, H., Wedler, T., Weitzenegger, P., Winters, A., Wipat, H., Yamamoto, K., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, H.-F., Yoshikawa, E., Zumstein, H., Yoshikawa und A. Danchin

- (1997), The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nature* 390, 249-256
- LaNauze, J. M., H., Rosenberg und D. C. Shaw** (1970), The enzymatic cleavage of the carbon-phosphorus bond: purification and properties of phosphonate, *Biochimica et Biophysica Acta* 212, 332-350
- Lee, K.-S., W. W., Metcalf und B. L. Wanner** (1992), Evidence for two phosphonate degradative pathways in *Enterobacter aerogenes*, *Journal of Bacteriology* 174, 2501-2510
- Lee, J., J., Six, A. P., King, C., van Kesse und D. E. Rolston** (2006), Tillage and field scale controls on greenhouse gas emissions, *Journal of Environmental Quality* 35, 714-725
- Lerbs, W., M., Stock und B. Parthier** (1990), Physiological aspects of glyphosate degradation in *Alcaligenes* sp. strain GL, *Archives in Microbiology* 153, 146-150
- Libert, F., A., Lefort, R., Okimoto, J., Womack und M. Georges** (1993), Construction of a bovine genomic library of large yeast artificial chromosome clones, *Genomics* 18, 270-276
- Liles, M. R., B. F., Manske, S. B., Bintrim, J., Handelsman und R. M. Goodman** (2003), A census of rRNA genes within a soil metagenomic library, *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2684-2691
- Liske, R. B.** (2002), Untersuchung zu antagonistisch wirksamen Mikroorganismen gegen *Fusarium culmorum* bei der Mälzung von Gerste und Weizen, Doktorarbeit, Technische Universität München, München
- Liu, C.-M., P. A., McLean, C. C., Sookdeo, und F. C. Cannon** (1991), Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*, *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1799-1804
- Lorenz, P., K., Liebeton, F., Niehaus und J. Eck** (2002a), Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: Accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space, *Current Opinion in Biotechnology* 13, 572-577
- Lorenz, P., K., Liebeton, F. Niehaus und J. Eck** (2002b), Expanding the scope: metagenomes as source of novel enzymes, Abstract FGB03, VAAM Jahrestagung, Göttingen
- Loughney, K., E., Lund und J. E. Dahlberg** (1983), Deletion of an rRNA gene set in *Bacillus subtilis*, *Journal of Bacteriology* 154, 529-532
- Madsen, K. H.** (1993), Weed control in glyphosate-tolerant sugarbeets (*Beta vulgaris* L.), *Weed Science Society of America Abstract* 33, 16
- Majernik, A., G., Gottschalk und R. Daniel** (2001), Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na⁺ (Li⁺)/H⁺ antiporter activity on *Escherichia*

- coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products, *Journal of Bacteriology* 183, 6645-6653
- Mc Auliffe, K. S., L. E., Hallas und C. F. Kulpa** (1990), Glyphosate degradation by *Agrobacterium radiobacter* isolated from activated sludge, *Journal of Industrial Microbiology* 6, 219-221
- McDowell, L. M., A., Schmidt, E. R., Cohen, D. R., Studelska und J. Schaefer** (1996), Structural constraints on the ternary complex of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from rotational echo double resonance NMR, *Journal of Molecular Biology* 256, 160-171
- Messing, J., B., Gronenborn, B., Müller-Hill und P. H. Hofschneider** (1977), Filamentous coliphage M13 as cloning vehicle. Insertion of a *Hind*III fragment of the *lac* regulatory region in M13 replicative form *in vitro*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74, 3642-3646
- Metcalf, W. W. und B. L. Wanner** (1991), Involvement of the *Escherichia coli phn* (*psiD*) gene cluster in assimilation of phosphorus in the form of phosphonates, phosphate, P_i esters and P_i, *Journal of Bacteriology* 173, 587-600
- Metcalf, W. W. und B. L. Wanner** (1993), Mutational analysis of an *E. coli* fourteen-gene operon for phosphonate degradation, using *TnpA* elements, *Journal of Bacteriology* 175, 3430-3442
- Miles, C. J. und H. A. Moye** (1988), Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soil, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36, 486-491
- Miller, J. H.** (1992), A short course in bacterial genetics, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Min, H., Y. F., Ye, Z. Y., Chen, W. X., Wu und D. Yufeng** (2001), Effects of butachlor on microbial populations and enzyme activities in paddy soil, *Journal of Environmental Science and Health Part B* 36, 581-595
- Mohanty, S. R., D. R., Nayak, Y. J., Babu und T. K. Adhya** (2004), Butachlor inhibits production and oxidation of methane in tropical rice soils under flooded condition, *Microbiological Research* 159, 193-201
- Moore, J. K., H. D., Braymer und A. D. Larson** (1983), Isolation of *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate, *Applied and Environmental Microbiology* 46, 316-320
- Moshier, L. J. und D. Penner** (1978), Factors influencing microbial degradation of

- glyphosate-¹⁴C to (CO₂)-¹⁴C in soil, *Weed Science* 26, 686-691
- Mullis, K. B., F. A., Faloona, S., Scharf, R. K., Saiki, G., Horn und H. A. Erlich** (1986), Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263-273
- Nachlas, M. M., S. I., Marquillies, J. D., Goldberg und A. M. Seligman** (1960), The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt, *Analytical Biochemistry* 1, 317-326
- Obojska, A., B., Lejczak und M. Kubrak** (1999), Degradation of phosphonates by streptomycete isolates, *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 872-876
- Obojska, A., N. G., Ternan, B., Lejczak, P., Kafarski und G. McMullan** (2002), Organophosphonate utilization by the thermophile *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20, *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2081-2084
- OECD** (1999), Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 10, ([http://www.olis.oecd.org/olis/1999doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(99\)9](http://www.olis.oecd.org/olis/1999doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(99)9))
- Oremland, R. S.** (1988), The biogeochemistry of methanogenic bacteria; in: Zehnder, A. J. B. (Hrsg.), *Biology of Anaerobic Microorganisms*, Wiley, New York, 641-702
- Osoegawa, K., P. Y., Woon, B., Zhao, E., Frengen, M., Tateno, J. J., Catanese und P. J. de Jong** (1998), An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries, *Genomics* 52, 1-8
- Pace, N. R., D. A., Stahl, D. J., Lane und G. J. Olsen** (1985), Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences, *ASM American Society for Microbiology News* 51, 4-12
- Parker, G. F., T. P., Higgins, T., Hawkes und R. L. Robson** (1999), *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti phn* genes: Characterisation and identification of their protein products, *Journal of Bacteriology* 181, 389-395
- Pell, M. B., B., Stenberg und L. Torstensson** (1998), Potential denitrification and nitrification test for evaluation of pesticide effects in soil, *Ambio* 27, 24-28
- Pipke, R., N., Amrhein, G. S., Jakob, J. Schaefer und G. M. Kishore** (1987), Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1, *European Journal of Biochemistry* 165, 267-273
- Pipke, R. und N. Amrhein** (1988), Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752, *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1293-1296

- Quaiser, A., T., Ochsenreiter, C., Lanz, S. C., Schuster, A. H., Treusch, J., Eck und C. Schleper** (2003), Acidobacteria from a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics, *Molecular Microbiology* 50, 563-575
- Quinn, J. P., J. M. M., Peden und R. E. Dick** (1988), Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide, *Applied Microbiology and Biotechnology* 29, 511-516
- Quinn, J. P., J. M. M., Peden und R. E. Dick** (1989), Carbon-phosphorus bond cleavage by Gram-positive and Gram-negative soil bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology* 31, 283-287
- Radomski, C., K., Seow, R., Warren und W. Yap** (1988), Method for isolating xylanase gene sequences from soil DNA, compositions useful in such method and compositions obtained thereby, US Patent *US 5849491*
- Rainey, F. A., N. L., Ward-Rainey, P. H., Janssen, H., Hippe und E. Stackebrandt** (1996), *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S-rRNA genes with heterogenous intervening sequences, *Microbiology* 142, 2087-2095
- Reimer, M., A., Farenhorst und J. Gaultier** (2005), Effect of manure on glyphosate and trifluralin mineralization in soil, *Journal of Environmental Science and Health Part B* 40, 605-617
- Roh, C., F., Villatte, B.-G., Kim und R. D. Schmid** (2006), Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 134, 97-112
- Rondon, M. R., S. J., Raffel, R. M., Goodman und J. Handelsman** (1999), Toward functional genomics in bacteria: Analysis of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 6451-6455
- Rondon, M. R., P. R., August, A. D., Bettermann, S. F., Brady, T. H., Grossman, M. R., Liles, K. A., Loiacono, B. A., Lynch, I. A., MacNeil, C., Minor, C. L., Tiong, M., Gilman, M. S., Osburne, J., Clardy, J., Handelsman und R. M. Goodman** (2000), Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2541-2547
- Rondon, M. R.** (2000): Ung-Jin, K. : How to build a BAC library, [WWW document], URL [http://www.tree.caltech.edu/protocols/BAC lib_construction.html](http://www.tree.caltech.edu/protocols/BAC_lib_construction.html)
- Roslycky, E. B.** (1982), Glyphosate and the response of the soil microbiota, *Soil Biology and*

Biochemistry 14, 87-92

- Roundup** (2002), Das Produkt Roundup, [WWW document], <http://www.roundup-ultra.de/produkt/produkt.html> und <http://www.roundup-ultra.de/vorernte/vorernte.html>
- Rueppel, M. L., B.B., Brightwell, J., Schaefer und J. T. Marvel** (1977), Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 25, 517-528
- Saez, F., C., Pozo, M. A., Gomez, M. V., Martinez-Toledo, B. Rodelas und J. Gonzales-Lopez** (2006), Growth and denitrifying activity of *Xanthobacter autotrophicus* CECT 7064 in the presence of selected pesticides, *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 563-567
- Saiki, R. K., D. H., Gelfand, S., Stoffel, S. J., Scharf, R., Higuchi, G. T., Horn, K. B., Mullis und H. A. Erlich** (1988), Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase, *Science* 239, 487-491
- Sambrook, J. und D. W. Russell** (2001), Molecular cloning: A laboratory manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York
- Schinner, F., R., Öhlinger und E. Kandeler** (Hrsg., 1991), Bodenbiologische Arbeitsmethoden, Springer-Verlag, Berlin, 192-194
- Schmeisser, C., C., Stöckigt, C., Raasch, J., Wingender, K. N., Timmis, D. F., Wenderoth, H.-C., Flemming, H., Liesgang, R. A., Schmitz, K.-E., Jaeger und W. R. Streit** (2003), Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks, *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7298-7309
- Schmidt, R., J., Putterill, J., West, G., Cnops, F., Robson, G., Coupland und C. Dean** (1994), Analysis of clones carrying repeated DNA sequences in two YAC libraries of *Arabidopsis thaliana* DNA, *The Plant Journal: for cell and molecular biology* 5, 735-744
- Schowaneck, D. und W. Verstraete** (1990), Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples, *Applied and Environmental Microbiology* 56, 895-903
- Seghers, D., D., Reheul, R., Bulche, W., Verstraete und E. M. Top** (2001), Do conventionally and biologically cultivated soils differ in bacterial diversity and community structure?, *Mededelingen* 66, 381-388
- Seow, K. T., G., Meurer, M., Gerlitz, E., Wendt-Pienkowski, C. R., Hutchinson und J. Davies** (1997), A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms, *Journal of Bacteriology* 179, 7360-7368
- Shizuya, H., B., Birren, U.-J., Kim, V., Mancino, T., Slepak, Y., Tachiri und M. Simon**

- (1992), Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 8794-9797
- Skarynsky, T., A., Mistry, A., Wonacott, S. E., Hutchinson, V. A., Kelly und K. Duncan** (1996), Structure of UDP-N-Acetylglucosamineenolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomycin, *Structure* 4, 1465-1474
- Song, J. S., J. H., Jeon, J. H., Lee, S H., Jeong, B. C., Jeong, S. J., Kim, J. H., Lee und S. H. Lee** (2005), Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea), *Journal of Microbiology* 43, 172-178
- Sorensen, S. R., A., Schultz, O. S., Jacobsen und J. Aamand** (2006), Sorption, desorption and mineralisation of the herbicide glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles, *Environmental Pollution* 141, 184-194
- Sprankle, P., W. F., Meggitt und D. Penner** (1975), Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in soil, *Weed Science* 23, 229-234
- Stackebrandt, und Goebel** (1994), Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S-rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology, *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 846-849
- Stein, J. L., T. L., Marsh, K. Y., Wu, H., Shizuya und E. F. DeLong** (1996), Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon, *Journal of Bacteriology* 178, 591-599
- Stock, M., M., Hieke, R. A., Weidhase und H. R. Schütte** (1991), Degradation of glyphosate in excised leaves of tobacco and sugar beet, *Journal of Plant Physiology* 139, 171-174
- Streit, W. R. und R. A. Schmitz** (2004), Metagenomics – the key to the uncultured microbes, *Current Opinion in Microbiology* 7, 492-498
- Strunk, O. und W. Ludwig** (1997), ARB: a software environment for sequence data, [WWW document], URL <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>
- Tan, S., R. Evans und B. Singh** (2006), Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops, *Amino Acids* 30, 195-204
- Tatusov, R. L., E. V., Konnin und D. J. Lipman** (1997), A genomic perspective on protein families, *Science* 278, 631-637
- Teeling, H., A. Meyerdierks, M., Bauer, R., Amann und F. O. Glockner** (2004),

- Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments, *Environmental Microbiology* 6, 938-947
- Ternan, N. G., J. W., Mc Grath, G., Mc Mullan und J. P. Quinn** (1998), Review: Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 635-647
- Ternan, N. G., J. T. G., Hamilton und J. P. Quinn** (2000), Initial *in vitro* characterisation of phosphonopyruvat hydrolase, a novel phosphate starvation-independent, carbon-phosphorus bond cleavage enzyme in *Burkholderia cepacia* Pal6, *Archives in Microbiology* 173, 35-41
- Thompson, J. D., D. G., Higgins und T. J. Gibson** (1994), CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680
- Thompson, J. D., D. G., Higgins und T. J. Gibson** (o. J.), CLUSTAL W modifiziert
- Torstensson, L.** (1985), Behaviour of glyphosate in soils and its degradation; in: Grossbard, E. und D. Atkinson (Hrsg.), *The herbicide glyphosate*, 1. Auflage, Butterworth & Co. Ltd, London
- Torsvik, V., J., Goksoyr und F. L. Daae** (1990), High diversity in DNA of soil bacteria, *Applied and Environmental Microbiology* 56, 782-787
- Torsvik, V., R., Sorheim und J. Goksoyr** (1996), Total bacterial diversity in soil and sediment communities, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 17, 170-178
- Transgen** (2003), Gentechnisch veränderte Pflanzen: Zulassungen weltweit, [WWW document], http://www.transgen.de/Anwendung/Pflanzen/Zulassung/soja_zul.html
- Treusch, A. H., A., Kletzin, G., Raddatz, T., Ochsenreiter, A., Quaiser, G., Meurer, S. C., Schuster und C. Schleper** (2004), Characterization of large-insert DNA libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea, *Environmental Microbiology* 6, 970-980
- Tringe, S. G., C., von Mehring, A., Kobayashi, A. A., Salamov, K., Chen, H. W., Chang, M., Podar, J. M., Short, E. J., Mathur, J. C., Detter, P., Bork, P., Hugenholtz und E. M. Rubin** (2005), Comparative Metagenomics of Microbial Communities, *Science* 308, 554-557
- Tyson, G. W., J., Chapman, P., Hugenholtz, E. E., Allen, R. J., Ram, P. M., Richardson, V. V., Solovyev, E. M. Rubin, D. S., Rokhsar und F. Banfield** (2004), Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment, *Nature* 428, 37-43

- Uchiyama, T., T., Abe, T., Ikemura und K. Watanabe** (2005), Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes, *Nature Biotechnology* 23, 88-93
- Venter, J. C., K., Remington, J. F., Heidelberg, A. L., Halpern, D., Rusch, J. A., Eisen, D., Wu, I., Paulsen, K. E., Nelson, W., Nelson, D. F., Fouts, S., Levy, A. H., Knap, M. W., Lomas, K., Nealon, O., White, J., Peterson, J., Hoffman, R., Parsons, H., Badentillson, C., Pfannkoch, Y.-H., Rogers und H. O. Smith** (2004), Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science* 304, 66-74
- von Wirén-Lehr, S., D., Komosa, W. E., Gläßgen, H., Sandermann, J. Scheunert und I. Scheunert** (1997), Mineralization of [¹⁴C] glyphosate and its plant-associated residues in arable soils originating from different farming systems, *Pesticide Science* 51, 436-442
- Wackett, L. P., S. L., Shames, C. P., Venditti und C. T. Walsh** (1987), Bacterial carbon-phosphorus lyase: products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism, *Journal of Bacteriology* 169, 710-717
- Wang, X., H. Wang und C. Tan** (2005), Degradation and metabolism of hexazinone by two isolated bacterial strains from soil, *Chemosphere* 61, 1468-1474
- Wanner, B. L. und W. W. Metcalf** (1992), Molecular genetic studies of a 10,9 kb operon in *E. coli* for phosphonate uptake and biodegradation, *FEMS Microbiology Letters* 100, 133-140
- Wanner, B. L.** (1994), Molecular genetics of carbon-phosphorus bond cleavage in bacteria, *Biodegradation* 5, 175-184
- Weiss, B., A., Jaquemin-Sablon, T., Live, G., Fared und C. Richardson** (1968), Enzymatic breakage and joining of desoxyribonucleic acids, *Journal of Biological Chemistry* 234, 4543-4555
- Wexler, M., P. L., Bond, D. J., Richardson und A. W. B. Johnston** (2005), A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase, *Environmental Microbiology* 7, 1917-1926
- White, A. K. und W. W. Metcalf** (2004), Two C-P-lyase operons in *Pseudomonas stutzeri* and their roles in the oxidation of phosphonates, phosphate, and hypophosphite, *Journal of Bacteriology* 186, 4730-4739
- Xu, J., X., Qiu, J., Dai, H., Cao, M., Yang, J. Zang und M. Xu** (2006), Isolation and characterization of a *Pseudomonas oleovorans* degrading the chloroacetamide herbicide acetochlor, *Biodegradation* 17, 219-225
- Yakovleva, G. M., S.-K., Kim und B. L. Wanner** (1998), Phosphonate-independent

- expression of the carbon-phosphorus lyase activity of *Escherichia coli*, *Applied Microbiological Biotechnology* 49, 573-578
- Yang, L., Y. H., Zhao, B. X., Zhang, C. H., Yang und X. Zhang** (2005), Isolation and characterization of a chlorpyrifos und 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium, *FEMS Microbiology Letters* 251, 67-73
- Yanisch-Perron, C., J., Vieira und J. Messing** (1985), Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33, 103-119
- Young, C. C., R. L., Burghoff, L. G., Keim, V., Minak-Bernero, J. R., Lute und S. M. Hinton** (1993), Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils, *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1972-1974
- Yue, J., G., Huang, W., Liang, Z., Jiao, Z., Liang, C., Wang und Y. Shi** (2003), Relationship between CH₄ and N₂O emissions and related microorganism populations in paddy soils under different water management regimes, *Journal of Applied Ecology (China)* 14, 2273-2277
- Yun, J., S., Kang, S., Park, H., Yoon, M.-J., Kim, S., Heu und S. Ryu** (2004), Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library, *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7229-7235
- Zeleznick, L. D., T. C., Myers und E. B. Titchner** (1963), Growth of *Escherichia coli* on methyl- and ethylphosphonic acids, *Biochimica et Biophysica Acta* 78, 546-547
- Zimmer, R. und A. M. Gibbins** (1997), Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library, *Genomics* 42, 217-226
- Zhou, J., M. A., Bruns und J. M. Tiedje** (1996), DNA recovery from soils of diverse composition, *Applied and Environmental Microbiology* 62, 316-322

8. Anhang

Anhang 1: Sequenzen: 16S-rRNS-Genfragmente der im INT-Test positiven Bodenisolat

>A17-32(<<612R<<>>609V>>)

TGCGGCCATTATCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAA
CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCCTAGACGAACAGCAAGGCGAGTAAGTGCCTTTGTGT
GACGGTATAGsAGAAGAArGCCCCGTCwAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATAsGTAGGGGCCAAGCGTTGCCGAATTA
TTGGGskTAmAGCGCGkCAGGCGGTTATTTAAGTTGGGTGTTAAGCCCGGGCTCAACCCCGGTTCCGATCCAAACTGGTT
GACTTGAGTGAGGAGAGAAAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGCAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGAGAA
GGCGACTTTTTGGCCTATAACTGACGTTGAGGCGCGmAAGCGTGGGGAGCmAACAGGATTAGTTACCCTGGTAGTCCCCGCC
GTAAACGATGCATACTAGGTGTTGGGGATTTCGATTCTCGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGTATGCCGCTGGGGAGTACG
CTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGAATATCCTAGAGATAGGGTAGGCCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATG
GTTGTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACTTyGGGT
GGGCACTCTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTACTACAATGGTCGGTACAACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCTAAAAAGCCGATCTCAGTTCCG
ATTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGT
CTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGCCGCCGA
AGGTGGGGTAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTATG

>A17-35(<<612R<<>>609V>>)

GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCAAGGACTGCATGGTTTTTGGTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGC
GGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGC
CGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCA
CCGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGATTTCGTAG
GCGGTTTGTGCGCTCGTTTGTGAAACTCACAGCTCAACTGTGAGCCTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGG
GAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGT
AACTGACGCTGAGGArCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCGCTAG
GTGTGGGTTCTTCCACGGGATCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTT
GACATATACCGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGTCTGTGTCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTAAGAGACT
GCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATG
GCCGGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCG
ACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCC
GTCACGTATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGA
TTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTG

>A17-41(616V>>><<630R)

GAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAAC
GTACCCTTTACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAAGATTTATCGGTAAGGG
ATCGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGGCAGCATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGAT
CCAGCCATGCCCGGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAG
AAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGTAGGCCGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTGTCTTGAGTATGGA
AGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTC
CATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGT
TAGCCGTCGGGCAGTATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCT
TGACATGCCCCGGCTACTTGCAGAGATGCAAGGTTCCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGGCACTCTAAGGGGAC
TGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAA
TGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTC
GAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
GTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGCAGCTAACACGGTAGGGTACGCGACTG
GGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCT

>NM5(<<612R<<>>609V>>>)

CTGGTTTTCTCGCATGAGAGAATCATGAAACACGGAGyAATCTGTGGCTTATAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
AGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCCTAGACGAACAGCAAGGCGAGTAAGTGCCTTTGTGTGACGGTATAGGAGAAGAAAGC
CCCkCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCA
GGCGGTTAATTAAGTTGGGTGTTTAAAGCCGGGGCTCAACCCGGTTCGCATCCAAAAGTGGTTGACTTGAGTGTAGGAGAG
GAAAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGCCTATA
ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGCATACTAG
GTGTTGGGGATTGATTCTCGGTGCCGAAGTTAACACAGTAAGTATGCCGCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGA
CATCCGGATGTAACACCTAGAGATAGGkGCCCTCTTCGGAGCAyyGrAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTG
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACTTyGGTGGGCACTCTAAGATGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTAATAAATGGT
CGGTACAACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCTATAAGCCGATCTCAGTTCGGATTGCAAGGCTGCAACTCGCC
TGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGTAGATGATTG
GGGTGAAGTC

>NM36(616V>>><<630R)

GAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGAGTTGATrGAAGCTTGCTTyCTTGATrTTAGCGGCGGACGGGTG

AGTAACACGTAGGCAACCTGCCCTCAAGTTTGGGACAACCTACCGGAAACGGTAGCTAATACCGAATAATTGTTTTCTTCGCCT
GAAGrAAACTGGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGGGGATGGGCTCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAG
CTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTTGGGAGAGTAACTGCTCTCAAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGGCGGTCAATTAAG
TCTGGTGTTAATCCCAGGGCTCAACCCCGGATCGCACTGGAAACTGGGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCC
ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGACTCTCTGGGCTGTAACTGACGTGAGGC
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTTTCG
ATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC_{yswm}TG_{Ay}CG
rTGCAGAGATGT_{Ay}CTT_{Ty}CTTCGGrAC_{Akwsr}AGACAGGTGGTGCATGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATATTTAGTTGCCAGC_{Ay}TTCGGrTGGGCACTCTAGATAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCCGGTACAACGGGCTGC
GAAATCGCGAGATGGAGCCAATCCCAACAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAA
TTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTA
TAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAG
GTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCT

>NM37((<<612R<<>>609V>>>))

CTTACTACGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGTAAGGGATCGG
CCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGC
CATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCC
CCGGTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG
GCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTGTCTTGAGTATGGAAGAG
GTGAGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATT
ACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGC
CGTCGGGAGTATACTGTTCCGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA_{AA}ACTCA
AAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGAC
ATGCCCGCTACTTGCAGAGATGCAAGGTTCCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTG
GAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGACGAGCGCAACCCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCC
GGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGT
GGTGACAGTGGGACGAGACAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGT
GCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC
ACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGCAGCTAACACGGTAGGGTACAGCGACTGGGGTG
AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCTTT_mTG

>NM39((<<612R<<>>609V>>>))

ATACCGCATAACGACCTAAGGGAGAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTATAGGGGGCGCCGATGGCAGATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC

CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAAACCTCTTGGATAATACCTGAGGGGGATGACGGTACCGGAAGAAT
AAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTG
CGCAGGCGGTTTGTAAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGG
GAACTGCATTTGTGACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGT
GGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAG
TTGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGAT
TAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAACCCTGCTGAAAGGTGGGGGTGCTCGAAAGAGAA
CCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTC
CTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGG
CCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCTAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCAGAAA
ACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG
TGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGCTAGTCTAACCGCAAG
GAGGACGGTACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACC
TCCTTTATG

>NM50(616V>>><<630R)

GAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGGCAACCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAG
TAATACATCGGAACGTGTCTTGAGTGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGATTAATACCGCATAACGATCTCTGGATGAAAGC
GGGGACCGAAAGCCTCGCGCTCAAGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGGCGAC
GATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCC
GGAAAGAAAACCTTCTCTAATACAGrGGTGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTCGyTAAGACCGATGTGAA
ATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCA
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCG
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTCGGGCTTCATTGACTTGTA
ACGAAGTAAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAC
AAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAACCTTGCCGAGAGG
TGAGGGTCCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCG
AGGTGGAGCCAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGA
AGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATC
GGAAGGTGCGGCT

Anhang 2: *phnJ*-Genfragmente der Bodenisolat>A17:32(*phnJ1*)

TTCGGATGAATCGGTAATGCCGTGACGATTAAGAAGCTGATCGATAAAACAACGGGTATTCTACGGTAGATGCAACCAAG
GATGCTACGTTGATCCAATCCAGACACCGTATTCCGGAAGTCCCCTAGACGCAGGGCAAATCCTCGTCTTGCAGGTTCCGAT
GCCGGAGCCGCTGCGGATGTACGAATCCAGTGAAGTGGAGACCAAACGTCTGCATGGGGAGAAAGATTACAGCGGGGCCCTG
GTTGATGCTATTGAGCAAATCATGAAGTACGGCAGTGTATCCACGGGTGCGGATCATCCGGTTATGGTTCATGACCGCTATG
TCATGGCGCAAGCCCGATTCCGAAATTCGACAATCCGAAGATGAAGTATTCCGAAGCTTTAATTTTACTGGGTGCSGGRCGM
RARAAGMRR

>NM5(*phnJ1*)

GAATCGGTAATGCCGTAGCATTAAAGAAGTTGATCGACAAAACAACGGGAGTTCCTACGGTAGACGCGACTAAGGATGCTA
CGTTGATCCAATCCGACATCGTATTCCGGAAGTCCCCTAGACGCAGGGCAAATCCTCGTCTTGCAGGTTCCGATGCCGGAG
CCGCTTCGGATGTACGAATCCAGTGAAGTGGAGACCAAACGTCTGCATGGGGAGAAAGATTACAGTGGAGCCTGGTTGATGT
TATTGAGCAAATCATGAAATACGGCAGTGTATCCACAGGTGCGGATCATCCGGTTATGGTGCATGACCGCTATGTTATGG
CGCAAGCCCGATTCCGAAGTTCGATAATCCGAAGATGAAGTATTCCGAGGCTTTAATTTTGCTAGGTGCSGGACGMRAAAA
GMVRCCTTGTGATCGATGACGACAAGATCATTCTCTACAAGTTCAATCCCATTTGCCGGRCGMRAAAAAGMRR

Anhang 3: Sequenzen: Endsequenzierungsansatz der Metagenombank (Vektor bereits entfernt)

>1A-B2

CACAACAATTCGTCGATGAGGCGCGGCACAGGCAGGTGCGGAGTGATCGCGTGTTCGAAGAAGCAGCCAGGCAACTGCGGT
GGCACTATCAATGGTGCCTTTCATGAATCTTGGCGATACTCGTGGTCAAACACTTGCCGACCTGGTGCTTGATGAAGGC
CCTCGGTGGTTCCTGCTCACGGCGCCTTTATACCGCTTGAGTTTGCTGACGCGGCTTATCGATACGGCCACTGTCAGATC
CGCCACCGGTATCTGCTGAATCGAGAGACCAAGCCGATGCCGGTGTTCGCGACTCCTCGGGTTCGGGAGATCCCGCGTGA
GCGTGCCGTTGATTGGACCTGTTCTTCGATACACCAGGCAAACGCACGGCACAGCGCTCAAAAAGATCGACGGGAAATTA
GTGCGATCACTCATCCAGTTACCTGTTGCGCTCACGGGCGAGTGCGAGATTGACGACTATCATTCCCTCGCGGTGCGTGATCT
GCAACGCGGGCAAGGCGTGGGGCTTCCGTCTGGAGAAGCGGTAGCCCGCCATCTCGGAATCGCGCCACTACCGCGGCGCAG
ATTTGCGTGCCTCTACAGGTTGGCATGCCGAGACTCCACTGTGGTACTACGACTCCGCGAGGCGCCGCTTGCACCGGCGG
TCACCGTCTTGCCCGGTTGGCGGTCGTATCGTAGCCGAGGTTCTGATCGGTCTGATCAAT

>1A-C7

CCTCCACAACGTCCTCTGAAATCTGCACAGCTCATGAGAACGCCCCGAGGCTGTAAACCGACTGAGTCAGTTTGTCAACATT
TTCAGGCGAACTTCGGTGCAGACAAACCTCTGGCTTCGAGATGTTCCAGTTTTAGGTCTGGCGAAAACCTAGTCTAGAGCGACT
AGGGGAAAGGCTGGGCGGCTTACCCTGAGCACAATTGTACACAGCGCTGGGAGCAGCGCAATTCGGAAGTTAAGTGTGCC
AACAGCGTTTACATTGAGAAATTTGGCCGATCCGGGCCAGTGAGTGATATTGATTCCATAACAACCGCGCTCCAGGCCCG
AGTAACTTTGGTGGTGGCAACCAACCAAGGCTCGGGCAGAAAGGAGCCGGACCATGATCATTATAGGAGCAGATTATCAC
CCGGGCTTCAACAAATTGCTTTTGTAGATACGGAAACGGGAGATTGTGGAGAGCAGCGATTGCAACACCGCGAGGAAGCTG
AGAAGTTCTACCGGATCTCGCAGCTCAGGGAACGAAGGTGCGCGTGGGGATGGAAGCCAGTGGGCATGCACGCTGGTTTCA
GCGACTGCTGGCGGAGCTGAACATCGAGTTATGGATTGGCGACGCGCGGAGATTGCGACGAAACAGGTGCGCAAGCGGAA
GACGGATCGAGAGGATGCCCGGCTGCTGCTGCGCTTGTGCGGGAAGATCGCTTTCCGC

>1A-D10

GTTGCCATGGTTCGACATCGACCACTTCAAGCACGTCAACGACAAATTCGGCCATATGTTTGGTGACGCTGTGCTTAAGCGCGT
TGCTTCAACCCTGCAAGGCGCCGTAACAGAGGGGACACCGTGTACCGGTTTGGCGGCGAAGAGTCTCTCGTCATTGCCGCCT
GCCCGATATCGCTGACGCACGGTTGCTGGTGAAGTGCTCAGAGAAGCAGTCGCCCGGGTCAACTTCCAGCATCGGGCGAA
CCGGCCTGCATTGCACGTGACCGTATCGGGGGAGTAGCCGTATTTCGATGCAGCGTCAGGCCCGTTTGAACACGTGATCGAG
CTGGCAGACCAGGCCCTTACCGGGCCAAGGCTAACGGCCGCAACAGAGTCGAGCTTGTGGCAGGTTTGAAGCTGAAAAGC
GGCCAGCCGCTAGCTCATAGCACAAACCTGCGCTGAGCCTTGACGTAACTTGTTAAGCATTAGTATGGCCGCGAACCGGCG
CACTGCCCGGTCAACGATGCGTTTCTCGCAGAGGAGAACCCTTAGATGATCATCGACGCTCACGCCATACAAACGGCGGCA
ACCTGGGTAACACAAAGCTGGCTTGTGGCCTCGCGTGCCTGGCCCGTCCGAGTTTACCAGAACGAAGACCAGCTGCG
CACCGCAGTCAACCACCACATGACCACGATCATGGACAAGGTGGGACGGACATTAGTTCTCTC

>1A-G9

CCGGCCTGTTTCGTCGAGCAGCAGCGGGTGGTGGTGCCAAGTGGGACCCGGCAACTTGAGCAGGGCCTGGAGCAGACGGTGG
ACGTGCGTCGCCGAAACAGGTCCATGCCCGGGTGACCAGCGTGACGCCGTCGGCCGCATCGTCGAGCGTCACCGCGAGGT
GATAGCTCGCTGGCGTCTCGGCTTCTTGCACACCAGCACCAGGTGCCCGTGAAGCTCGGGCCGGGCGACCTGCTCGCCATG
CGTTGGTCGATCCACGCCAGCGGTCCGGTGCGGCCGAGCGCCGCGCCACGTTGAGCCGCCAGGGCAGCCGCTTCGCCAGGCG
CGAACGAAGCGCCGCGGAGGTGCCCGGTAATCGTCCGTCGGGCCCTCGGCCGTCGCGGCTCGCGAATCTCGATCCG
CGTGCAACGGCACGGGTAGAGCAGCCCCATCGCGCGCAGCCGCTCGGCCGCCGCTTCATAGGCCGCCAGCCGCGCCGATTGC
GCGGGCACCTCGTCCACTCGAGCCCCAGCCAGGCGAGGTGGCACGAACTCGCGCTCCAGCTCGGGCCGCGAGCGCACGC
CGTCGATATCTCGATCTGAGCAGGAAGCACCCGCTCCGCGCTTGGGCCAGGTCATGCGCCACGATCGCCGAATACGCGTG
GCCGAGGTGACGCGGGCCGTTGGGACTGGGGGCGAAACGAGTAACCACCATTCTCTCTC

>1A-H12

GGCACGAACTATCCGAAAGGTCCTCTCAAATGGGCGGACGAGATCGGCCTTGACCTGGTGTTCATATCTCAAGTCACTGCA
GGCATCGCTGGGCGACGAGCGCTACAGACCTGCACCCCTGCTTCGGCAGATGGTAAGATCAGGCGCGACGGGCGAGGCGGTG
GGCGAGGGGTGGCACACGCCCGGCGAGAAAGGGATGGTCTGACCACCGGGTTGAACCACAAAGGCACAAAGAGCACAAATA
TCGAGACCGGGTTACCAAGCGTGGGTTTCTCAACCCAGGATCAGGCGCAGACTGATGGTGCACCATGTGCCGCTGGCGGT
GGTGGCCGCTAACCTGACCTTACGATATTGCTGCTGACGCCCTCGGCAAGCTCGCATTTCCGCGCTGAGCATTGCCACAGCCT
ATGTGGGGCTGATCTTTTGGCCGTGACACTGGCTGTTGGCCCGCTGAACTACTTCGGGGGCTGCGCAATCCAGTGTGAGC
GACCTGAGCGGGATATAGGTATCTGGGCGGGCATAACGGGTTTGTTCACGTGCTGGTGGTGGCTTCCCTCGGCAGTAT
TATCTTTCTATCTTCGTGAAACGGGAGAGAAGTTCGGCCTGACGCTGCGGACGGATATAATCGGCCTGGCGAACGATTCG
GCCTGCTGGCGACCGTGTACTCTTTTCTTGTGCTACTCTCGAACGACTGGACACTCAGC

>2A-A2

CGGGAACGTGTCGGGCACGGTCCCGGTTTCCACCGTCATGGCCTGGTTCTCTCCAGTGTGGGCGTAGTGTAGCCGCCCCGT
CAACCGGGGGTGTCTTTTGGTTGACAATCGGGGTTCTGTCGCCCGGGGAAACGCCCTGCAAACGCTCGCCGACCTGCTCGCC
GCCTGCTCTGGACGCGCTCCCTCGCGCCCGCCAGCTCGCGCGCGTGGAGGCCGAGACGGTGGTGGCGACTTCCCGCCG
GCGCGTACGTCTGCCGAAAGGGCGACCCGGTGCACCACTGGATCGGCGTGATCGACGGCCTCGTGAAGATGGCGAGCGTGAG
CCCGAGGGGAAGACCACCAGTTTCGCGGGCGTGACGAGCGGGCTGGTTCCGGCGAAGGCTCCCTCTTGAAGGACAAGGC
GCGGCGCTACGACATCGGGGCCCTTCGCGGAGCCGCATGGCGCTCATGCCGCGTCCACCTTCGAGTGGCTCTGGACACC
GACATCGGCTTCAACCGTTCTCTCATGCAGCTGAACGAGCGGCTTTCGAGTTCATCGCGATGGTTCGAGTACCAGCGGCT
CCTGGGGCCCGACGCCCGGGTGGCGCGCTCGCTCGCGGCGCTTCAATCCGGTGTCTATCCCGCCAGGGCAGCGAGATCC

AGATCTCGCAGGAGGAAGTGGGCTACCTCTCCGGCGTCTCGCGCCAGCGGGTGAACCGCGCGCTC

>2A-B6

TGCGTATGGTGCTCGCAGCGTATGCTTTTTTCAGAACTGTCGGAGGAGCTGTTGCCTGGCCACTGCAACCGTTTCGTCATTCT
CTGCTTCCATCTCGGAAGAATTGGCGGCAGACCGCTGGAATACAGGGGTCAACAGCTGCCTTCTTATGTGGATCCCCAGTAT
AACTGCCAGATGGAAATGTTGCGGTTCTATTCTGGGCGCCAAACCCTAGGTTTCGATTTCGTGGATCGGTGAAATCGGGCGGG
AAATTGCACGTACGCCGGTGATTTTCGGGAATGCTGCCGGAGCTGGCTTGGATGAATGTACCCAACCCGATTCTCAGCAGACA
AACGACGGTAGGCTAACGGTTTCGGAGCTCTGCCATGCGGGCTCGTAAGCCCGGGGAAACCAGTCATCCGGCGAGGATATGT
CGAGATCCAGCAGATATCCGAAACCCTGGTCCGCCTCGCACCGCGTCACTTCCGCCGCTACTTCTTGTGCTCGACGGTAATT
CCGATCGGAGATCCCGCAGCCAAGGGAAAACCTGCTCTGCACCGTCGCGCCATGCTCCCAGACTTCCAGCAGGATTGCGTTCTC
CGACGCCGACGTCCGGGCGCAGGTTTCGCAACCGATCCTCAGCATCTCCAAGCATGCAAAGTGCGGTTCTGCAACATGCGCA
CCTGAAATTGATAGCATATCCAGCGATAGCATATCCTAAGTTAAGCAACTGGAGGGCC

>2A-E11

CCAGAGCAATGGCCCCTACGGCGATGCGGGCGGTACGCTGACCATTACGGCTTCGACTCGAGCCGTATTTTCGACAGCGTTCC
ACGGCGTTCCGATGAACGACTCGGGCAATTACGCGCTCTTCTCGCAAGAGCAGCTCGACCCCGAGCTGATCAGCGAGGTCAA
CGTCAGCGTCGGCTCGACCGACCTCGATAGCCCAGCGGCTCCGCCACCGGGCGCACCGTCAACTATGTGCTGCGCGATCCG
ACCGACCAGATGCATGCCCGGTACAAGGCTCCCTGGGCTCGTTTCGCATTCCACCGGTTCTTTGGCGTGTTCGACACCGGGCG
GTTTACGCCCTTCGGCACGAAGGCTTTCGTCGCGGCGAGCGATCAGAGGGACCACAATCCGTTTCGATTTCGAGCGGAAGATC
CACAAGATCCAGCTCAACGGCAAAGTCTACCAGCCGCTCGGGCGGACAAATTCGTTCTCGGTGAACGCTTTCTATGTCCGCAA
CCGAGGACAGAGGTTCAACGACGTCACGCTGGCGACTTTCGCCACTCAACGACGGACACGTCACTGAAACCGCCTGCATGC
ACGATCGGAAGGCGCCCCGATATCGGGCAAGAAGGACACCGCCGATCCCAAGTGCGGCCTCGCGTCGGCAGGCTATTTTG
GCTACGGTTTTAAACCCTGCCACATCTTCCGCTTGACCTGACCTCGCGGCTCACGCTGG

>2A-F8

TCCCAATCTTCGGACCGCTTCTGCATAAGATCAGTATGTCACCTTTTCTCACGGACATTTGCTCAGTTGATCCGTAGTGGTGTGC
CTATCTCGAGGTCCTGGATATTGTGGCGGTTTCATCAGGCAACCATGTCGTTGAGGAAAGCATCAAAGGCGTGAGTCTCGAT
GTAGAAAAGGGTGACAATCTCTCCATCGCGATGTCGAAAAAGAAGATTTTCCGCCATGCTACTGCGCATGGTGGCGGCTG
GTGAGTCGACCGGCCAATCGATTCCATGCTGGAATAAATGGCCGGCTTCTGGGATGAAAAAAAAAACACAAAAGCTCAA
TGCGCTTACTTCGTTGATTGTGCCGTTTCTGATCGGGTTTTGACTGTGATCGTCAGTGG

>2A-G3

AGGCACGAAGGTTACGCGGCGCCTTGCGTTGAGCCCGGCAGCATGGGAATCGTGAAGGAGAACGTCGTAGTCTGACCGACG
ATGCTCTCCGCCAGATGTGGCCGCCATGTGCTTCGACGAGATTTCTGCAGATGTACAACCCGACGCCGAGTCTGGCACCTG
TCCGTTGCGTCTTCTCGCTCCGTGTGAATCGTTTGAACAGCTTCGGCATCTCGGCGGGCTCAATCCCGCCGCCCGATTGCG
TACGGCGACTCTGTACTCCGAACCGTACGCCGCGAGTTTCGATCGCGATCTCGTCGTCGGCCAGCCGTAATTGGCCGCGTTCA
CGATTAGATTTCCGAGGACCTGCTCCAGGCGAAGGACGTCAACGAGTGCAGGAGCCGGCCTACCAGTGCCTTGAATCGCAC
CGGATGGCCAGGCGCCAGCGACGACGCCGCTCGACGGCGTTCGTCATGAACGATGCGAGATCGGTTTCAACCCGCTCGAGC
GAGAGGCGGTGCACTTCGATCCGCGCCACATCCAACAAATCATAGATATACTTGTTCAGACGGGTCGTGGATCGTCGGATTTCG
CTAGGCGACTCTCCGGCAGTCTCCCTTTGCCCCCGG

>3A-B5

GTGCCGCGCCGAGATAGAGCACGCTTTTGACCTTCGCCAGATCCTGCGCGAGCCGCTCGATCTGCGGCTCCAACGTCAGGGC
CGCCGCCATGTGGCGGCGCTCTCGATCAGCGCTTGCACCAGTTTCTGCTCGTTCGGTTCGCCGACAATTCGCCACGCGCCCTGC

CCGCGCAAGCGCAAGGCAGGCCAGCACGGCGAGCTGACAGGTGAACGCTTTGGTGGAGGCAACGCCGATCTCCGGACCCG
CCAAAGTCGGCATTGCGATATCGCTTTTCGCGGGCGATTGTGGACGTCGGGACATTACGACCGAGAGCACATGCTGCTTGTTC
TCGTGCGCGTAGCGCAGCGAGGCGAGCGTATCGGCGGTTTCGCCCCACTGCGAGACGAAGATCGCGAGATTGCCCGGATCGA
GCGGCGTGCCGCGATAACGGAATTCGGAGGGCGATATCGATCTCCACCGGAATCTTGGCGAAACGCTCGAACCAGTATTTCCG
GACCAGCCCCGAATAAAACGCGGTGCCACAGGCCGAGATCGAAAGACGTTTCAGCTTCTCCAGTCGAACGGCAATTCTTGC
GGCAGCACGACGCGCTCTTTTGTATGTGATGTAGTGCGGAGCGTATGGCCGACCACTTCGGGCTGCTCGTGGATTTCCTT
GGCCATGAAAGTGCTTGTGATTGCCCTTGTCCCACGACCCTGTGCGGAGGCGGTGCGATTTGAG

>3A-C8

GAGTATTCTATAGTGTACCTAAAAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAT
TCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTG
CGCTACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGGAACCCCTTGGCGCCG
CCGGGCCGTCGACCAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGAATTTCTGCCATTCATCCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGT
AGCAACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGAGTACTGTTGTAAT
TCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCG
CTTGCGTATAATATTTGCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAACTGGTGAA
ACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACTCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTCACCGTAAC
GCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCTGGAAATCGTCGTGGTATTAACTCCAGA

>3A-D12

ACTTTGTCATTAATATGCAGTTAATTTTCAAATGGAATCACGGTAATAGTCGTAATTAATAATCCTGCTTTATGTACTCAAAAT
ATTTTATGATATGTCTGATTACTTTTGATGAAATGGACTGTAATTTTGTTTTACCCATTATGTCCGACTTATTAACCATAACC
ACCATACCCGGTCATGTATTGATGTATAAATATGGTATTATTATTAATCACAACCTCCTTTAATGGAGTCAGATGTAATAAG
CTGTTTCTGCTCTAAGTTAAATTCGATTACAGTGGTGTCTTGTATTTTCATTTAATTAATTAATAGTGGTGTCCCGTCTGGTGA
TTCTTCTTGGAAATTTTGTGTCATCTTCTCTTAGCATCTCAATGTTCTTATTTTGTCCGGTTGAAAATAATTGAATAAT
CCATTTCTGACTGCCGGATATGTTTCATATTTATAATGTTCAATTTAATAGCATTGCATTTTATAAGTAACCTCCTCTGTTT
CCTTATCTTTGATATTGCGTTCGTATTATCTCACTGGCTATAGTGAGCGTCATTAAGAATATTGTTATCCACGTTGCATTACTC
ATGCGTAAAATGTTGGCTGTTCACTGTGTCTTTTTCGCTTCTTCAATCTTGCGTAGAATAGGACTAACCTTTCCCTGTGAA
CTACATCTACCAATATTCGTCCTGTG

>3A-E4

AGGCAATAACAGACCGTACCGTATACCGACACTGGTGGGTGGGCAGATGATCTGCCAAGGCGCTTGAGAGAACTCGGGTTAA
GGAACCTGCAAATTGATACCGTAACTTCGGAAGAAGGTATGCCTTCGATCGTGTATGGATTTACTTCAGAAGCGAACGAAG
GTCGCAGGTAATCGGTGGCTGCGACTGTTTACCAAAAACACAGCACTCTGCTAACACGAAAGTGGATGTATAGGGTGTGACG
CCTGCCCGGTGCCGGAAGGTTAAGTGATGGGGTCAGCCGCAAGGCGAAGCTCTTGATCGAAGCCCCGGTAAACGGCGGCCGT
AACTATGAAGAGAAGATGCAGCGCGCAGAGTTTGACCGAATTGTAGTTACGTAATAAACTTGGCTATTTGCTGGAAACTC
CGAGCATCTTCGATACTCGTCGCGCAAGCGGCAGTGACAAATCGTGAGGTGCGGACAATCAGCAGGAAAGGCTCACGGTCCG
AATGGGCGAACCAAGGAAGGTTTCGTTGCACCGGGAGAATCCTCAGAGACTGCACGCCAAGCTGCGACAAGCCATGATCGGCG
GGTGCGGATGATACAGTCCGATCTGCATAGCGATATGCAGGAAAGTCTTCGACGCTGGAAGACTTCGCGAACGATGTGTCA
AGCATCGCACGCAACACATTGAACGGTCCTAAGGTAGCGTAAATTAATTGTCGGG

>3A-F3

GCGAGGTGGCGTGCAAAGAATGGAACCAAGGTGCCGGATGACGGCTTACCTGGTCGGGAAATTCCTATGATAACACCGGCCA

CCTCGGCGCATCGACCTGGCGGCATGTCATGTTCTGGAACAGGACCGCGCGAAGGGAAATCAAGTCACGGGACCGATGTCG
TTAGGCGGGCGGAAGATCCGTTCCGCTGGGTTTTCTGTGCGGATGTTTGAAGCATTGCGAGGAAGCCGGCTGTCTCGAGGC
GTGCCCCACCGGATCGATTGTCCGAACGGAAGTCGGCTCTGTGCTCGTGCAAAACGATGTCTGCAATGGTTGCGGCTACTGCG
TTGTTTCATGTCGTTCCGGCGTGATCGATCGCCGGCCGTCGCCGTTACCAGACCACGGCGGCGCATTCAAGTGCACGTTTTGT
ATGACCGGCAAAAAGAGCGGACTGGTTCCGGCCTGCGCAAAAAGTTTGCCCGACGGAATCGATCGTCTTCGGCCGGCTCGATGA
TTTGGCTGCGCGCGGTGCACAGCGCGTGCAGCAATTGCGGGAGAGCGGTTACGCCGACGCGCAGGTGTATGATCCCGAAGAA
ACGAGCGTGCAGCGGATTACAGCCTTCTTTCTCATTCTTGGCGAACCCGAAGCCTACGGACTTCCGCCGAGGCCGAGATTCC
AACCATTTACCTGAAGTCAGCCTGGACCGCGCTTTTCGCGACCGCGATTGCATCAATCATCGCCACC

>3A-H1

CGGCCTTTGTGCGACGATGCGCTTGGCCTTCCCGAGCGAGCGCTCGATGCCGCCGCTTTCACGACCCGTACCTCGGCGCTGA
CGCCGATCAGGCTCTTGATCATATGCGAGAGCCTGGCACCCGCGGCGTCGCTGTGCGCGCCGCCGGCGCCGGGCGCTCGCTC
GACCAGCACGGTCAGCTCATCGAGCACCTTGGTGCAGTAATCTCGAGCTGGTAATGCGGCGCCAGAGCCTCCTGCTTGAGG
ATCAGCTCCTCGACCTGCGTCGAAACACGTTGACGCCGCGGATGATCAGCATGTCGTCGGAGCGCCCGGTGATTTTTTCCAT
GCGGCGCATCGAGCGCGCTCGGCGGCAACAGGCGCGTCAGGTGCGCGTGCATAGCGGACGATCGGCAGCGCTTCTTTG
GTCAACGAGGTGATCACCAGCTCGCCTTTTTCGCCGTCGGCAGACAGCTGCCGGTCTCGGGATCGATCACCTCCGATAGAA
GTGGTCTCCAGATCGTCAGGCCGCTCTGGTTTCGATGCATTCCTGCGCGACGCCGGGCCGATCACCTCGGACAGGCCGT
AGATGTCGAGCGCGTCGATGCCGAGCCTGCCCTCGATCGACTGCCGCATCGTCGCGGTCCACGGCTCGGCGCCGAACATGCC
GATCTGGAGCGATGTCTGCCGCGGATCGATACTTTGCCGCTCCATTTCTCGGCGATCGC

>4A-A5

CGGATTCCTCGAAGCACTCCGTTGTTCAAGAAAGGAATAATTACGATGGCTAAAAAGAAAAAGACTACCCAGCAGAGCGTA
AGGTTCTTGCATGTGAAAAGAGTTCAAGAGGTTCAAGAGATCTCGTACTCGAGCTGGAGAAAATTAAGAAAGAAATAGA
AGAAATGGGAGTATTGGGATTTGGGGCCGCAAGAAAAACGCTGAACGTAGTACAGTCGACAAGACGATTCTAACGCTGCT
TCTGCAAAACACATTGCGTAAGTCGAGCAGAACGCGCCGACAAGTCCAAGTGCAGCGGGCCAGGAGCTTGTTCGCTACTGGC
GAGACGATCGGCTGTTGTTTCATAATTTGCCAGGCAGGTGACCGTCTCCGGAAGGCCGTTACGCGGGAGGTTCTCTCTTTT
TTAGCAAGTGGCGAACGCAGAAAGAAGCACTCGCTCATTTCGCGCCTATACGCCAAAGAGCGTACGTTCCGGCTCTCTCGC
AATTGGCGAAAACAAGGGCTGTTGCTTGTGAAAGGCTCAGCGCAGGCAATGCACGACAGCCGGCTGGTAACAGAGTGGTCGCC
CTGGTTGCCGAAGGTAGCTTTTCAATTTTCCACCAAGAATACGGTCTTCGTCGATGATAATTTGAGTTTAAATGAGTGAAAAG
CGATCCTTCAAAAACGTGTCAGCCTAGATCTTTAAAAGTGT

>4A-C3

CGGCGTGATCAAGGCTGCGCAGGCGCGCGGCGATTTCGACGTGCTGACCGAACCGGCCGCGCTGCGCTGCGGGTGCATCTG
AAGGGCGATCTCAAATCAGGCCTCAAGATGCTCGATGCCGCGATTGCCGAGGCGTTGAGTTAAAAAGGACAAGCTGCATGC
AACTCGGATGATCGGCCTCGGCCGAATGGGCGCAATATCGTCCGCCGGCTGATGAAAGTGGACACACGACGGTCGTTTA
CGACAAGGACGAAAAGGCCGTGGCGGCGCTTCCGCGGACGGTGTGGACGGCGCAAGGCCGCTGGAAGACTTCGTCGCCAA
GCTGGAGAAGCCGCGCACGGCATGGGTGATGCTGCCCGCCGGAAGATACCGAGGCCACGATCGAAGCGCTGGCGAAGCT
GATGGAGAAAGGCGACGTCATCATCGACGGCGGCAACACCTTCTGGCAGGACGACGTCGCCCGCGCAAGGCGCTGAGGGA
GCGCGCATCCATTATGTCGATGTCGGCACCTCCGGCGGCATCTGGGGCATCGACCGCGGCTATTGCATGATGATCGCGGGCG
ACAAGGCCGTGGTCGACCGGCTCGATCCGATCTTCCAGTCTTGGCCGGGCATCGGTGACATCCCGCGCACCGACGGACG
CGAGAGCCGCGATCCCGCATCGAGCAGGGCTACATCCATGCCGGCCCCGTCGGCGCCGGCATTTT

>4A-D5

TCGTACAGGATGCCGAGCACCAGGTAGATGACCAGGATCGCGAGCACCAGGAGCACCAGGAGCCCCCTGCTGTGCCGCTGGA
ACGCCTGCGCCGTGCCGAGAAGCCGGTCGAGATGCTCGAGGGCAGCGTCTGCCGAGCCGCTCTCGACCTTGCCGTCGC
GTCGCCCAGCGAGACGCCGGCATCCAGGTTGAAGGAGAGCGTCACCGACGGCAGCTGGCCGAGTGGTTCACGCTGAGGGG
GCCGGTCGTCGCCGGAACCTCGCCACCGACGCGAGCGGCACCGCCTCGCCGTTCCGCCCGGTGATGTGCAGCAGGTTGAGG
GCGGAGAGATCCTTCTGGTACTGGGGCAAGAGTCCATCACCACCCAGTACTGGTTGTTGGGCGTGAGGATGGTGCTCACCTG
CCGGGCGCCGTACGCGTTGTACAGGGCGGTCTCGATCTGGGTACGTCGATGCCGAGCGCCGACGCGCGGTGCGGGTCGATC
GTCACCTGCACCTGCGGGTTTTTACCTGGAGGTGCTGGTTACGTCGGTGAGACCGGGGATCGAGTGCAGCTTTGCCTCGAG
CTTGACGCGCCGTCATAGAGCGCGTCCATGTCCGAGCTCTGAAGCGTGAACGGTACTGGCTCTTCGACCCGCGGCCCGCA
TGTTGATCGGGCGGATTCTGCACGAACACCCGCATACCCGGCACCGCCGCGAGCTTCCC

>4A-F10

CTCCGGGTGAGGGGAATCAATTGAATCTTGCTGTCGTCGTCGCCCTGCGGCACCGGTCTGCCGTTCTCGTCGCGACCGCGG
CGATTGTAAAACCAATCCCAGAAATCGCCGTGATCATCGTTCTGCTCGCGGGCGGGGTGGCGGACGATCTGCTTGTTCGTC
GCCGGGATAGACGGTGCAGCGCCGCCGGATTCTGTCGTCGTTCCCGAAGGCGTATAGACGTCGCCGTGCCGAAGATGCCG
ACATCGACGGGCGGTGCGGTTTCGATTGTGAGCGGGCTCGCGGCAAGCCATTTCGCCGTCGTCATCACGGCATGCCA
GATCGTCGCCGGCAGCGCACCGCCGGTGACGCTTTTCATCGGTGTCGATCGTTCGTTGCCGACCCAAACGCTCGCCACATAAT
CCTGGTGAAGCCGATGAACCAGGCGTCGTGAAATCCTGCGTCGTGCCGGTCTTGCCGGCGCCCTGGTGGCCGGCGATGGC
GGCGCCGCGCCGGTTCCCTCGGTAACGACGCCATAGAGCATCGCGACGAGATCGCGGTTGACGTGGCTCGCGACGACGCGC
TCGGGATCCTCCGGCGGCTTTTCGCTGATAGAGCAGGTGGCCGCATGATCTTCGACCGCGGTCACGAAATAGGGATAGACCTT
CAAGCCGCCATTTCGGAACACCGCATAGGCGCGGTCAGCTCGAGCGGCGTCACTTCC

>5A-A1

CAGCTACCTGGCTCGACTGCTTGGGCCCAAGATTACGGTTTCTTGAATTTACGCTAGCGGTGATGGTTTTCTTACGCTCCC
AGTAGACTTAGGACTGGGCACTTATGGGGCTCGGGAAATCGCCCGCCATCCGGATGAGGCCGCGGATTGTTGCGCGAAATC
ACAGGATTGCGAATGGCGCTTTCGCTATTCTTTGGCGGCGTTGAGTATCTTCATTCTGCTTCTTACAAAATCTTCAAATTG
AAGATCTTGCTAGCCATGTATGGAGTGAGCCTGCTGGGCGGACCTTTTCTGCTCCAATGGTTCTTCCAGGCGCATGATCAAAT
GCGCTGGGTTGGATGGGCTTCTGTCGTTCCGCAACCGGGCTTTCAGGCTTAGTATTCTGGTGTCCGTAAGGAACGCCGC
TGCTTTACATCGGCCTCATCGAATGCGCCTCGGTTACGGCTGTCGTTGTCTTCTGCCTCTTCGTCGCCCGGAATAAGATGGGTT
TTACTTTCCCTCACCTGACCTGCAGATTCGCGCTTCTGAACCATCTCAGCGAGTCGGCCCCATCGGCCTGACGGAACCTCG
CCTGGGATTATGTGGTATTTCTGCACCGTTCTGCTGGGTTTCTGTTCTCAGACGCGACGTTGGGGTGGTGGGGAGCGTCCC
ATCGGGCCTTGATGGCTTTCACACGTTTCGTCGCTGCTGACTTCTTCAACCTG

>5A-C10

TGGCGAGGAAGCCATCGATAGTTTTACGCGTATTGGCGTCCAGGGCGCCCGGGCCTTCGTAAGCGGCCGCGGAGCATATTC
AAACAACGCGAGCGGCATCTGCTCGGGATGTTCTTCTGCTGTCCAGCAAAACACCGGCCAGCATATAGGATGCCTGGGCA
TTGGTAGGATCTGCCTGAAGTGTTTGGTCAACTCTGTCTGAGCCTTAGCAGCATCTTTTTCCGTGGCTCCAACATAGCCGAGC
GTAAATTGAGCAAAGTTCACCATTTGATGGCTTGGTCTTTGCCAAGCGTCGTCGGCGACCCCTTGGGGCTTCTTATCAGCGCC
GTACACCGCATCTGGATTCCGCAACAAAGCTCGGGCAACCTTCTCGGTGGTGTCCAGGTCTGCCTATTTTGGAGCGGAAAGCG
GAGCATTGGGCTGCTGCGGCATCAGTCCCGGATGTAGCCAGGATCTCCTGAATGGAAGCAGCGTCGTTCCGGTCACTCTTG
AGAATCTCCACTGCGGTGTCGAAAGCCCGCCGATGATTGTTTCATCTGCTGATACGTAAGCAGGTAATCTTAAGGCGGTATC
GGCATACTCGCTGCGGGTAGCTGCTTCCATTTTCAAGTTTTGCAGACGCGCTGCCGGCGGGCGTCCGGTTTCACAAT

CTCCGTGTAAGAGCGTACTCTTGTGGTCTTTCCAGTTCTTTTTAGCTGCTTCAG

>5A-D6

CTCGAAAAACGAGCCGCGAAAAAATAATTTTGGCCACGAAACACACGAATTGACGCGAATTTCCGCTTCATTAATTAGGAC
TGTCATGTTGAGCGAAGCGAAACATCTCGATCTATTAGTCGCGGGTAACCGCTCAGTGATATGGGCTCACACTGTTGAAA
AAATTGCGGCGCGGCATGCGGATGGCCTCGCTCCGGGCACAGTCGTACGCAGCGGCGATTCGTTTCGATTGCCCCGCGCCAC
GTGATGACGCACGACAACACCGGCGCGGTGATTCCGAAATTCAGCAGATCGGGGCGACATCGATTGCCGATCCGGCACAGC
CGGTGTTCCGATCGATCACGATATCAAAATACTTCGCCGAAAATCTGGCGAAGTACGCGAAGATCGAGACGTTCCGCGC
CGAGCACGACATCGATTTCTACCCAGCGGGAACCGGCATTTCCCATCAAGTGATGATCGAACAGGGCTATGTCGTTCCGGGGT
CGATGGTGGTCGCCAGCGATTCCACTCCAATCTCTACGGCGCGATGGCGGCACTCGGGACGCCGGTCGTGCGCACCGATGC
CGCGAGCATCTGGGCGACCGGAGTTACGTGGTGGCAGGTTCCCCAGTGCGGAAGGTCGTGCTAAAGGGAAAACTTTCGCCA
GGCGTGGTCGGAAGATGTGATCATCGCGTTATGCGGACTGTTCAACAAAGAC

>5A-E9

CCTGATTGATCAGCTCGAGCATTCCCGCGGAAGGGTCGTAGGCGCCACCAGGAGTTTGCGATACGTGCTCTGCCGGCTGTAG
CCGGTGAGGTAGTTGAACAGCTCGGCATGTGCGGTGTCACCTGAGCATCCCGGTTGAAAAGGGCGACGTCCTCATATGCGC
CGGCCGTCGACGCGTTGTAGTTGCCCGTGCCGATGTGCGCGTAGCGCCGACTCCCTCGCCCTCTGCCGCACGACCAGCATG
AGCTTGGCGTGCCTTCAAGCCGACGAGGCCGTAACGACATGCACGCCGCTTCTCCAGCGCTTTGGCCCATACGATGTT
CGCCTGCTCGTCGCCGCGGGCTTTCAGCTCCACGAGCGGACGACCTGCTTGCTGATTGCGCGCCTTCTTCAGCGCCCGC
CCATTGGGCTCTCAGTCCGGACGTTGATACATCGCCACCTTGATTCCGAGTACGTCCTTGTACGAGAGGCCTGTTTCGATG
AATGCCTCGACCGAGGTGATGAATGAGTCGTATGGGTGGTGTACGAGAAGGTCTCCATCTCGAATCACCTCGAAGAAGTCGA
TCGGCTCGCCCGCTCGGACCTAAGCCGTGGTTGGGTGGCGGCGAGCCAGGCGCGGATTCGTACGCGCTTGAAGGGGAAT
CGAAAGAAGGCCGGTCAGATCCAGCATCCCCGTCACCGAGTACACGTCGTCGGACCCGAGC

>5A-G7

GTTCCATCTCAGCATTGTACGCGTCTTCCGGAGGTTGACGGATAGGTGCAACTTAAGATCTGAACGCCCGGAGCCAGAC
GCTCACGCTCCTGCCGTAATTGGAAAACTTGCAGGGCCATGTTCTGGTCCGTCGCTCCGACCGAAAGCACCCCGGGCCAT
TGCAGGGATAGAACGCATTCTTATCATCGCTCAGCGGATTGCCAACTGATCGCCATTACCGGACGACGCAACGACAAGAGC
ATTACGCTGCTCGGCTTCGATGAGGAATGTGTTGGCAAACGTTTGATCGCCAGAGACCTGTCCGCCCCACGAGCAATTGATCA
CACGCGGCCATGCGTCGACGATAATGAATGCCTTCATAGCCTCCGAAATATTCGATGATGCATCGTTCCAGCAGCCTTG
ATCGCATCAGGCGACATCAAAGCCAGATCCGGCGATGCCAAGCCATTATTACCTGTCGCTGCAATGCAGCCGGCGGTAT
GTGAGCCATGTGATTACCAGGATAGTCGGCATTGGATCTTCATCGGGCTGAAATGGCTCGCCGGCGCTAACATTGCCGACG
ACATCGTCCCGATCTTGATCGCGTCTTCAGATCTTCATGCTTTGTGTTGAAGCCATCGTCCACATCGGCGATGAGGATCGTG
CTATCGCCTTTCGTGACGTCACCGCCGCTTCGAGATGCATGTTCCGCGATCGCATATTGCGAG

>6A-A3

CGTCATTTCAATCATGGCCTGATCGAGCGCCGGCCAATTTCTCCTGCTCGGGCGTGAGCTTGAGCCCGGCTTTGAACGCAG
CGACATGCGCCGAGTGAATGCGGCCATATGCTCTGCCATAACGAGCGCTGTTGATCGGCAGCGGTGGGTGCGGGCGCAGC
AGCAGCGGCGGGTTTTGCAGCGCCGGCGCGCCGACTGCTGTTGGGCGTACACAAGCGACGAGCCGGCAAGCATCAACGAT
GCAGTCCGACGAGAAGTCTTCCACATGGTTTCCAGCGGTGTGCAACCGGCGCTGCCATCTCAGGATGACAGGGTCAA
AATCAGTCAGCGACGCTGATCCACCCGCGACGACTGTAGTCTTGGTTGGCGGGCGGCGCAATCGTAACACGAGGGAGTC
CAGCCACGATCGCGTTAACAGGAAAAAGAGCCGGTTAACGAGGCAACCGGCCATAACTCGACATAATCCCGGCACGACGGA
CAGCCGAACCGGGATTCCGATACGATTTAGACACCATATCGAGCCGAAAGTTCATTCTGCAGCGCCGGCATGGCCAATCTG

CGCAGACCGCCAAAGCGGACGTTGAGTGCTTGTGGCGGTGTTTACACGCACGTTAGCCGACCAATCCCCGGAACGGGGATC
GGTCTTCAATTGTTCTGCGAAATGCGTGAACCTAGCCGGCGTCGGTCGAGTGAATGCGGGCGG

>6A-B8

GAGCCCAATCGCACTATAGAAGGAGAGGCAACTGGCGGTTTCGGGCGTATGGGCTGTGTGCGGTGGCAAACAGGAGCGACAG
TACTTTGCCCTGACTCTGGGCCGACGTCTGCGCCAGGTTGGTCACGTCTATGCCCCACATTGTCTCTTCATCCCCATCTTTAGG
GTGTACTCGGCTGGTGCTAAGGGGGGGCCGCAACGACCTGTTGCGAGCCAGAAAACAGACTGCCGGGGGCGGCCCTTACCAAC
TGGCCATTGCGATAGAGGCCGCCACTCGTCGCACTGACGGCCGTGTCGAGGCTGGTGGCACAATCGTGTTCGTTGGCAGCGG
CGGCTGCCACAAACTCGTCGGGGAACAGCCCGTGGAGTCATAAAAGTTTTGCACCCGGCCTCTTTGGAAGAGGAGCGTTGC
CTTTTGGATCTTGGTACTGCCTATCTGACCCAGATCAAACGTCACCAGGCCTTCGCGCCACAGAGTGGTCACCTGTGGGCAGG
CCGGGTCTGGGCCGATTTGGAGATGCATATACCCGACAGCGAATCCATAAGGATTACGGATAAACCAATAATCGGGAGCTTG
GGCCGCGCCAGGTGTATCCGTTTGCCTTGGAGTAATGGGATCACAGGTGGTGCCTGCGTAAGTGGATCCAAACGCGTACATG
CTCGTCGGTGGAAACGGTGCCAGAGGTGAAACCGACATCGCTGAACGTCATAC

>6A-C11

GCCTCGTCCCGCTCGACGAGCTGGCGGAGCGGGCCGTCGAGATCGAATCGGAAAAGGATCGGCTGGTGGTCTGCTACTGCCA
CCACGGCGTTTCGACGCTGCACGCTGCGCTCATCTCGGCGCCGCCGGTTCAAGGACGCGGTCTCCCTGCGCGCGGGATCG
AGGCGTGGTCGAAATGATCGACCCGGCCGTCCTAGATACTAGGTGGTCGCCCTTGAATGTCGTACTCAGCGATTCCAA
AGAGGCGCGCGCAGTTCCCCGAGCACGCGCGCTTCGTCGGCCGAGGCAACTCGAGGGCGGAACCACTTTCAGCTCGCG
GGACCACTCGTACGGGAGGTTGGGGAAGTCGGTCCGTAGAGGATGCGGTGCGGACGCCGGCGCAGGATTTCCGCATCCGGC
CCTCTCGGAAAGTAGCCAGCGATTGCCATGGTGGTGTGAGGTAGAGGTGCTCGAACTCGTCGAGCATCGCCTCGAACTTTTC
GGGCTCGTCCCAGCCGAGGTGCGGCACGATGCAGATCGTGTGCGGATGCTTCTCGAGCGCGGGCGCAGACGGACGGCTCCC
GAAAGCGCGCGCACGTCGACTCCGTACCCTTCCGAGGCTGGCTCGCGCCCGCAATGGATGACGATCGGCTTGCATGCCGGG
CGCAGGCGCGGAAGACGGGATCGAGGCGCTCGTCGTCGGGAGCGATGCGCATGACGTGCGAGTGG

>6A-E12

ATCCGGGACTCTATTTACCCGAGACGGCTGCCGCCGACGAGGACGGCTATTACTGGATCACCGGGCAGTTGACGACGT
AATAAACGTCTCCGGCCACCGCATCGGCACCGCCGAAGTGGAAGCGCGCTCGTCGCGCATCCAAGGTGGCCGAGGCCGCG
GTCGTGCTTACCCGCACGACATCAAAGGACAGGCGATCTACGCCTTTGTCACGCTCAACGTCGGCGAAGACGGCGACGACG
CGCTGCGCAAGGAACTGAACCAGGAAGTGCGAAGGACATTGGTGCATTGCCCGCGCCGACAAGATCCACTTACGCCGGC
GCTGCCAAAGACCCGCTCGGCAAGATCATGCGCCGATCTCCGCAAGATCGCCGAAGGCGGACCTCCGGCTCGGCGAT
ACATCGACCCTCGCCGATCCGAGCGTCGTGACGCGCTGCTCGCGGGCCGTCAGTGAGGCTCGCCGACCCGACGAATCGT
CCTGCTCGCCGGCAGCGCTTCGGCGGCTCCCGAAACGGCGAAGTCTGACCTACCGCATTCTTCAACGGCCATAGCCACGCCG
ACAACGTGCTCAGGATCGCCTTCCACGGGCCAGCCAAGCTCATTGTGACAGCGTCGGCGGCAAGGGCGACCGCGGCGATTT
CGTGCTCATCGACACGGTGCACGAAGGCGATAAGCCCGTCCGACGCGCAAAATGGGTGATGCAG

>6A-H7

TTTGAATGCCTGATCGAGCATATTCTCAACCATGTTCACTACTGGTCTTTCCGAAAGGCTGTAAGAAATAACTTCGTTGTTGAA
GAGATCTATTACTGGAGACAAATACAGCTTGCGCCATTGACTGCAAATTCAGTAACATCGGTAACCCACTTCTCGTTTGGCC
GCGTAGCCTTGAATCTCTTTGGAGAACATTAGGGGCGGTTTGCCTACCTCTCCTCTGTAAGAGCGGTATCGCTTGACCTTA
ATCGCTGCTTTAAGTGAGAGGGTTCCCATCAGGCGCTGAACAGCTTTATGGTTAATCTGTTTCCCTTCTCGATGAAGAGACAG
CGTTACCCTACGGTATCCGTATCGGCTCTATTCTCGTGATAAATCTCACTAATACGCTTTTAAACGTCCGCATACTTGTGACG
CTTGCTGAGAGCCTTTAGATGATAATAAAACGTAAGTACTGCGCGGTATCTCCGACGCCCTGAGAAGCTCATCAAGAGGATAAAAC

TGCCTTAGCTCGTTGAGTACTTTCACCTTTTTCGTGGGATGAGCTAAGGCTTTCAGCTTTTTTAGATACATAAGCCGCGTTTCAA
GAAATCGAACTTGCCTTTCAGATCCTCAATGCGTCGGTCTTTTGACAGCTCCAATGCTGATGCCGCTTTTTCTGGATCAACTG
ATATTGCAATGTTCTTTTGGTGCCAATCTTGAGCGCGCGTAAACCAGCTTCTCCGCGCT

>7A-D12

TGACCCAAGTAGCTCGGGAACATTCCCGAAACAAGGTCAGCACATCGAAACGCATGACGCTTTGCTCATGGTTCCGCGGCG
CGCGGGTGCCGGCCACGGTTTTTCAGTTTTCAATATTAATGGTATCTATTCCGAAACGCTTGCCGCCTGTTCCGGCGACTCGCT
GGTGAGGCCTTCGTCGCTGCTGGGGGCCGACGCGGCAGGGGCCCTCGGGTTCGCTGGACGGCACAAAAACCGGCGTGCCCGCT
TCGGGCACGATGCGCGGCATGCCAGACGTTGCGGGGCTGTGCGCTGTTGCTCGACGTGGGTCCC GCCGGCGCCATACTTCTT
GATCAGCGTGCGGACCTTGTCGGACGGCTGAGCGCCAACGCCAGCCAATAATTGATTCTCTCGGGTTTTAGCAGCGCGCGG
GCGTCCGCTCGCTGACCATGGGGTCGTAGGTGCCAATCTTCCAGCACGCGGCCGTTCCCGGATTGCGCGAGTCGATCGC
GCAAATGCGAAAGAACGGGCGATGCTTGCGGCCCATTTTTTCATGCGAATCTTACTGCCACACGTTTCTCTGTTGGTTG
AGTAAAAAGGATGTTCTCGGCTGGTTCTTCCACGCGGAATCCCGGACAAGTCGCGGGGCTAAATAAGTTCTCGCTAGT
TGCTTTTCTTGCCCTCGCGCTTGCGGGCGCGCAGATCTTTTCTCGCTGTTTTCGCAACTTGGC

>7A-E1

TGGCAAGATGGGCCGAGCGATCAATCGAGTGGTTGCTGTAATCACAAAATGGTGGCAATCGCTGTTCCCCACCCGGAAGG
ATCAACTCAGCTTTCAAAACACTTCTCCGCTCCTACTTGGATCACTCAGCTACTGCTCTATGCCATAATCTCGGTTTGATCAT
AGCAGCGCGCTCATCGTCTTCGCATCTCGCTCGATCCAAGAAAAAGCCGCTTCCAATTGGGTGCGCAATGCCGGTTACGC
CGAATCTCGAAAGTGAACGACTGTTGCTGATGAGCTCCCGAAGATCAATGGCTGCTTTGGCTCGCCGTAAGCTGGAGGA
GGGCGAACCTCGTCTGGCATTGCGCGCACTATTTCTCGCGTTCTCTTTGCTAGGCGCCCAACGCTGATCGTCTGTTGGCG
ATCTAAATCGAACTCCGACTATGAGACTGAATTAAGGCGACGAAGATCGGCGGAATTGACCGAGCTATTTAGAGGCAGTCGC
CGGCTGTTTGAACGCTGCTGGTACGGAGATTACCCCGTTACCAATGTCGAAATTGAGCAGTCGACTAATTCTATCAGCGCCT
GAAACATGCCTGCCTCGCGGAAAAATAAGATCTTGGCCTACTTTTTGGTGTGGCCACGATCGGGACATTCGTTGTCGTCGCG
CTGCAAACGTTGAGGTGCGCCTCGAAACGCAAGAGGGATATCCCGTCCGCTCAAGTTT

>7A-F5

GTCGTAATCTTGTGTCAGTGAACGTGTCGTCGACGATGGCGACGCCGCGATAGCGCTTCGGGTCGGAGGCGATGCAGTCGAGC
ATCGCCGCTTGTGTCAGTGCCGTGGCAGCTCGCTGCACGATACCGAGCGTTCGACGCCGAGATGGTCATGCAACGCACGCA
GCATTTCTTCGGAGCATCTGCGGCGTGTAGCGCCGGCCCGGCGCATAAGGAAATTTGGCGGCCGGGCCGAACACGTGACA
ATGCGCGTCGGTTCGCGCCCGGCGGCGAGCTTGAAGCGCGGCTTGCAGCGCTTAGCGAGAAATGCGGCATGGATGTTTCATGGAG
AGCGTTTAGCGAAGCGCGCGCAGCTACAAGGTCAGGGATTGGCCGGGATATCGCCGCGCTGCCAGCAGGCCATCGTCTCG
GCGCGAACGCCTCGAAGCGGCTGTTTCGATGGCCGCGGCATACCGCCATCAGGTCCTGGTAATAGGCAAGATTGACGG
TCGAGAGCAGCACCTGGCCGAGCATCTCATTGGCTTTGGTGAGATGATGCAGATAGGCGCGGAAAACTCACGCGCCGCGG
ATGCGCGCCTTGTCTGTCGAGCGGGCGGGCGTCTGTTGGCGTGGCGGGCGTTGACAGATTGATCGCGCGAAGCGCGTAAAG
GTCATGCCGTGGCGGCCGTTGCGGGTCGGCAGCACGCAGTCAAACATGTCGATGCCCCGCGCA

>8A-D10

GTTGCTTATCTTCTTTATTCTGTACACAGCGAAACTTTACTCTTCATAAGACTCCTGGAATTTATATCCATGGTATTTATGTTG
ATATTCTTATCGACGTCAAAAAATTGGAACCAGCCTAATAGAAACGCTCATAAAAAATAGCCAAAGAAAAAGATTTTGAAG
AATTGAATTTGCTCTTTACGGAACAACAAAATAGGAGAATTTTCTTGAAGTTTATTATTCAAGGAAATTTGATTTTATTAA
ACCCATGCGTTTACTACTAAAATAATTAATCTTTTACCTTTTGCTAACCTAAGATCTGAAAAATACGGATAAATGTCATA
TGTCGGTAAGTCTAAACATAACAATATTCAGAAAAACACCAAATTTAGTCAATTCATCGCTAACTTTGGTAGAAAAGCTACCA

TCTATTATAGAAGAGTTTCAGCAAAAAAATGGAAAATGGATCACATCAAATTGTCAGCATATCCAGCAAGAGAATATTCATT
ATTATGGCATTACAAAAATCAGCAAATGCAACAGAAAGAAAACAAATGGTCTCATTAGCAACTCGCCTACTATATCAAGA
GATAAAATCACATATTTTGC AAATAATGAAACTTCCACCAGACACCAAGGTCATTCAAGTTGTCGGTGATTCCGCAACTTTTA
GTTAGATGGCACCGAAAGGGCAAAGGATTTTTTAAGAAAAAACTTACCGGATGATTGTGT

>8A-E5

GCGCTGCTGCTCGGCCAGGGCTGCTTGTGCTGAGCCACCATTTGATGAGCTGCAAGTCCGCGTGACGAGCAGCAAACAAGCGAG
CGACAACATCGAGCCGCCAGAGACCCAAACGCACCAAAGGCGATGCGCAGCGAGACCAACGGGTGAGAAAGGAGATAGA
CAGATCGGACAGGCACACACAGGAGACAACAGACCAAATCAGAGTTCGCGGCACTCGTCGACTACAAACAACGCGCGCAACG
CACCAGCGAGCTGCTGCTGCATATATGCCTGCTGCGCGGCTGCCTCGCGAGTCTGCAGGGCAATCTTCTCGGCGGGCGACAGA
ACGGGCGCGTGCATCACGACAGGAGGTGCTTGTGCACGCGCCGGTTGGTTGTATCTGTGTCGATTGATCATTTTCGACCATGAA
CAAGAAGCAAAAAACCACAAAATTGGTGCACAACAGCAACAACAACAGCACACACCCACACACTGAGTCTCCACCGAGA
GCGTACAGAGACAAGATGCTTTCGGGACTCCGCTGCGGGCTCAGTACACCCGCACCAGCGGGCGCGGTGGTTGGTTGCATGG
ACTGAGCTTGTGCAACCGGAACAGTGCCAACGGTTGCCACCTGCGCCATTCAAGGTGTGATCGGGTAAGAGCACATGTGTGC
GGCTCGGACTCTCGCGACAGCCAGCAACACACCTGTTTGGCGATGCTGTTGAACACGTTTGGATCG

>8A-G12

CGAGCCGTTTCGCTGGAGGATGAAGGTTTCGGCGCATTCCGAGCACTCCACCGAAGAGTCCCGCTTCGAACACGACATTGTCTC
GCGGAGAAGCCTGTCCGATTCCGGACC GGCGATGCCGGGAGGCTCGTGCTCGTCCAGTCGTCCGAGCAAACACAAAAGC
CGCAAAGTCCACTTGATGGCGAGGTCGAGGAGGCGTTCAGTGTGGTTGTCCAGGATTGAAGGATGTTGTCCACGGTTCA
ACGTGTGCGACATCTTCAAGACCAGTGTACGCGCTGCAGAAGTTTCTCTGCTTTCCTGACGAGCCTAGGAAGATGCGAGG
TTTGTCCATTCTCCCTTTGACAGTAGACCGAGCGAACGAGATTTCCAACCTTCCCCAACTAACAATCTCCAAGTGAGCTA
ACAACGACGATGCTACTCATTAGCGCTGATCGCCGAGTTCATAACTATACGCCAGCGATCCTGCGCTTGTATTTCAGTGAGTG
CCTGATCGAGCCTCTCCCTTTCGGTGGTGTGCGCCGGCACGTTGTGCGACGGATGGATGAACAGCCTCACGCCGCGTCACTC
AAAATCTCGGCGATGGTCGTGATAGTCATCCACACCACCGCCACGAACGCCATCGTCGATACCGGACCAACGTTGTCCACGT
GATTTCTCAGCGGAACCGACGAGTCCCCCGCTGGAACCCGGCTGTGATTACGACATCGGCG

>9A-B1

ATTCGACCAACCATCAGCGTCCGTCCTCAATCGTCGTTCCATGTATGAAGCTGCACAAGATCGAAGCTCTTGAGTTCGGCATTCT
CCAAACTCTTGTGGACAACTCCTCGATATGTTCCGGCGGATAACATTCATCCAACGAGTATTCGGCAGCGACGGCCACTGC
ATATTCTTCGGCGAAATTTTCGTAGCGGTGTAGATCTTTTTATCGGGGTTATTTTCGAACGAGCTTCCGAGCAGACCTTCACTT
CGTCCGTTTCCATACGCAAACGCCGTGTCAAAAAAATTGCACCCAAGATCGACCGCTCGCTGAAGCGCCGCTAGTACTCTTC
ATCGTTCGAGCCCGACCAGCTGCCATTCCCCACATGCCGTAACCGATATCGCTGACCTGCCAGCCGTCGCTCAAATGTTT
TATATTTTCATAGATTTTCAGTTGTCCAAATTAACGTCGAAAATAAAGATCATTATTGATGGCCTATTGTTAACATCGTGGATCGA
TTCCGGATCATTTTTTCAGCTTACTTTTCAATGCGGGCGGATCGCATATCGGCCAGCGGCTTCAATTTTCGTAGCCTTTTGC
GTTGGGGTGCAGGCCGTCGTTTGTAGCTTTCGCGAAAGAGCCTTTGTCATCCACGGTCGCCGTA AAAATAGTCGAGATAGA
CGAGACCACTTTCGGCGCAAAGGTTTTTCATCCAGCGATTCAAGTTCGTGGATC

>9A-F3

GGGGATGGCGTATTTAAGCGGCAGGAAAAGACTCGCGCCGACGCCAACGGCAATTGTGCCGGGGATGACGCTCGACCAGTTC
GGGCCTGGCGCCGTGGGTTGCAGCACCAGCCGAAGCGCCAATCCTGCGGTGAGGCCGGCAAAGGCCAAAGCAAGATAGGTC
AAGAGGTATGGGGCGGGCGCAATCCCATCCCAAGTGACCAGCCACCACAAAACCTCCAGCGCCGTTACGGCGACCATGA
CTCCGAGCCATGTGGCATCTTCGCCGAACCTGGCGGAGCCACGCTCGCTCGTGGTTCGCTGATGCGCGAACTTCAACTTGC

GTCAGTCCGACCATTGCAGCTCAGCCACTCGCAAGCTGGGAGGTGCCGTTGCTCGCCCGCGCGACTTCATCGAGCTCGTCCGG
CCATTGTGCGGGCGGTTGAGCTGCGGCGTCATGAACAGGATCGGGAGCTTGAGCAGGAGCAGCTCCCCGTGGATGAACGCA
TCGATCGCGCGCTCCCAACAGCTTGGCCGCCTTCGTCCATGCGCCCGCAGCCAATCGTCGTACGGCGCCCAATGGCTGGGCTC
GTCCCGTTGATGATCCGGAAGATTTTCATCAACGCCCCGTGTCAGCCACGACAGGGTGGCGCAGCAAAATCTGGACCTGC
CGGTAGCCCCGTTTCTCGGTGAGCGAGATACCCGGCACATGCGCTCGAACAGGTCTGTCGCG

>10A-G1

AACAGCAGCTGCCTCAGCAGCAGCCATTGATCTGACACAGAGGCATGCGACAAGCTCACGCAAGTTGTTACGAGTTTGAATT
CGAGTTGGAGGACGAGTTGTTGATGAACGTGCGATTGCGGGAGCAGACTCGTCCTCTCCGCTGCAAGACACGTCCGGTATGC
ATCAGAAACACACGTA CTGTCGTGTTGGCGCCAGGAACAGTGAAAACGCCGTCATCGAAGTTCTCTTCGGTCTCGTCAGCG
AGTTCGGCTTAGGCAGCTGCTTCTATCCAGCGGCAGCGTTGTGACACGCCGGCTTGGAGAACGAGTTGCGAATCGTGTC
GCCGGTGACCTCTCCAGGCTTGGTGCACCCACTGACACAGGACAGGCAGCGACGGCTTTCGCAGATTCCCGTCTTCGTGG
TCTCATGTGGACCATCAATAAGCCACTTGTTCAGAGCGCCGAATCGTGCCTTCACACTGCGGTTGATGCCAAATCGAGC
GGTTGGAAGATAGCGGTGAACCCAGCCGGAATGACAGCGATGGTGGTCTTGAGCTCCTTGAAGCGCTTCTTGATTTTCTCGGT
CAAGTGAACCTTGAACGAGTCAAGCACCAGGAGAGTGGGTTTCTCGAGGACAACCTGGCGTGCTCTGAGCCACACGCGCTCG
ATCCAGTCTTCATGTGCTCCTCGTCCATGTAGGAGTTCTCCTGCGCCACGACGATCATGCCAGC

>11A-C3

TCCGACTTCGGGCTCGCCATTGCCGCGACGTTTGAACAAGGGCGTCAACCAGCCGTCGGGAGGGACGCTTGACTACATGG
CGCCGGAACAAATGAGTAATCCCGAAAACGTCCGACCTTCGAGCGACGTCTATGGCCTGGGCGGGGTGCTGTATTATCTGCT
CACCGCAAGGCGCCGCGACGGCGCCGCGACAATCCGGTGTTCAGAGAGCAGGTCGAGCGTGGCGAGATCGACCAGGA
GCCGTGAGCGACCGCAAGATCCCGCGCCGGCTCGCCGAAATCTGCTTGCAGCGCTTGGCCGCGGATCCGAGCCAGCGCTAT
CGCACCGCCGGGACCATGGCGGACGAACTCGAGAAATACGTCCAACCTCGGACGCCCTGGCGGCGTTTTGGTTTGTTCGCTGT
GGCTGCGGTGGTTTTGCTGCTGGTCAGTTGGCCGATCTACCAACTCACGCGCCGGCCACCGATCCCAACGCGAAACGGCCGC
CCACTGATGACAAGAGGCAGCAACTCGTCCAGCCCAGTCCAACTACGCCGGCGAGCGCGCCCTGTCAAGCGTCCGGACGC
GCTGCGCCACTTCTTCTCGACGTGCGCCGCGGTGGCAAGGGGCACATTCCCAAAAACCGCCGACGACTCGCGCGCCTGATTC
CCTCAGCGGCGCCGACGAGTTCCGCATCGCCGCGTTGTGCCGATGGCATCCAACCCGCGCTTTTC

>11A-D6

ATCTTGAATTCGAGATAAGCTGTGCGCGTGGCTTGCCTTTCGCTTCCGCTTCGGCTCGGCTTGTAAATTCGACGCGCCGCGC
CAGTCGCACGCTTCGGCAATTCATAGCCTTGCAGCGGATTCACGATACTGTGGCAGTGGCTCGCCGTGGTAGAAGCGT
TTTTGACCTCTTGTCTTAGCTTCTCGATGTTGATGAACCTCTCCCTTCGTGTCAAACTCAGCGCCGAACCCCTCGGAGACC
ATCACGACACCTGCCGAACAGCGTTGGCTCATGGCTTCGGTGAAACATGCCATCCGCCGATTACGTGCATCGCGACAAT
TCCAACGATCTTGTGTCACCGTTCGCCAACGCACACAAAACAATTGTGCCGATTCGCCGCGTGTCTCAGCGTCGAAGCGGT
GGCGACCCACGAGCGCATTGTGGCGAGAATGTGTCACACCCAAAGTCGATAGTGTATCCGCGCGGACCCTTGTGCGCCGG
AGATCGCGTCATCGAAGATTGCGCAATCGCTGCGAGAATCGGATTTGTGCGCTCGTTCATACGCGCGGACGACAGCGACAG
CCTCACGAGCAACGACAACCTCGCGGTGAGTGTAGCGTTGCTGCATCTCGCGCGTGACGTGACCGGTACGCGCCATCGGGT
TTCCTCGGCGACGCCAGCATTCCGAGCAGTGAAGAAAACTGTGGCGCAGAGAATGGAATG

>11A-E5

CATGTA CTCTCCGAGGATAAGTGAACGGTCGTTATAGTGCGGGCGGGGCCGGGACGGCGCAAGCATCGTCTTCACTCCATA
AAGTCATGCGACCGTCGAGAGAACAGATGACGCGCTACGGACAGGTCTGTTTTTGTGCGGACTCTACGTGTTCTTCTCTGG
AGTTTGTGGATCAGGATGAGCGATTTGCTTCTCGCTTACGCCACGCCACGTGCGGGTATCCCAATCCGGCCCGACGTACAG

GGAGTCCGGAATGATTTTTGTCCGACTTAATTCGGGTGCGTTCGCACTGACGTTGTTGCGTTTTACGGACGCGCAGCTTTTC
GCCAGTATCACGTTTTCTTTTTCCGGTTTTCTGGGGCTTCTGCTTCCGTCGTCATCACTGCCTCTTGCTTCTTCTACGACT
TTATTCGGTACTTTGGCCCGCTCGTCGTAACAACCATGGGCAGATTGTCTTTCTGGCCACTTAATCGTGCCTGGCCTGCTCG
CGGGACAGTTATTTCCGGTTCCGCGTTCGAGCGTACGTAAGAATCTCTGGATGCCGAGAACCAGCGCTGGAATCTTGATGTT
TCGCCGAAACGGTGAGGGGATTGAAGTATTTCTGATTCACCCCGCGGACCTTTCTGGGCGAAGAAGGACGTTGGCGCGTGG
TCAATTCCGAAAGGTGAATACGGAGACGATGAAGCGCGCTCGACGCAGCGGCC

>12A-A2

AATGCTGGTTTTCCATTCTGCTTTTGAAGAATCTTTCAGTATCTTTATCGATAAAAATAAACATAGCATCCTTTCATTCTCTACT
TAGTAAAACACGATACGTATTTTTATCATTCTGTAAATTTTTCTTTTGATCTCTTTACAGTGCTATCGGAAGAATTTTCAGGA
TTTCTATCCAAAATTGGTTATCAAATTTGTATGTAAGATCCTTGCCGACTATTACACCAATATAGTCAAATTCAAATCCTTGA
ACCGTGTACACAGTACCGACCTGTTTTACACCATTGGATCATGTGCCAAAGTGATGCTGGGGGAATATCTTTACTGAGTCG
GAAGCCATCTTTTCTTCCAGGGCATTGCAAAGTCATCAATTACAACATCATTTTTCTAATGTTCCATCTGGTAAGGGATTTGT
CCATGGCCAACAAAATCCTGCTACTAAGCGTGCGGAATTGGGAACTTCATAGTCTTTTTGCTTATTTCTTGATAAAGTTCGAG
TGGTGATTCAACTATTTTAAAATCAAATCTTCTTTCTATCCAAAGAACATTAGCTGTTTTCCGAATTCCTAATGTGTTGTCA
ATCCAGTTGACAAATCCATCTGAACCTTGACATCTAAACTGAGCAATTAATTCATACTCATGAATTACACAGTTGTGTTAAT
GGCGTACTCTTTAATGTAATCCTGTGTGTCCAATTTCTTTTGGTC

>12A-E10

AGGGTTCGATTCCCTTACCCGCTCCAACGCGACATGCCTGGGGCATGCCGAAGCGTTGGAGCGCCGGAGCGAAGCGACGG
GCGACATTTCCGATCTGCCGGGAGATGTTCTGATTTGGAGCGCCCGAGCGAAGCGAAGGGGCGACAATCACCGCAGTCAC
ACGCGTTGACACACCGCACCCGCGCCGCAATTTGGCGCGCTGCCTGCACCGATGGAGAGGTGGCCGAGTGGTTAAAGGCAG
CAGACTGTAATCTGCCCAGCAAGCGTACGCTGGTTCGAATCCAGCCCTCTCCACCAGCATCATCCGCAGCCGGTCCGGGGG
ACTGGCGAGCATGATGCTGTGTCGAAAGAATCCCTAATCACTTGTAGCCGCGACATGGACGATATGTGACAGGCGGATGA
CAGCTCTTGGTCCGGACAGGTCGAGGGATCGCCGATCGAGGATCCGAGCAACCTCTGGATCATCCACGCAGCCGCCGGCCG
GTTGCTGCCGTGGTTCGTCGCTCGCGCATCTCTGCCAATTCAGTCTCCGTCGGGGGCTTCTTCATCGGAGCCGCTGCGGCTCT
CGTTACTCGCAATGGCGCGTCTGGCGATTGCACTCCTCGGATTGCTGCTGTCCGTAGGGTGGCTCATCGCCGATGGACTGG
ACGGCATGATCGCCCGAGCGACCAAGAGCGCCAGCGCGCTGGGGCGGTTCTCTCG

>12A-G3

GAGCGGCGTGAGGCTCTTCTCGTCGTCGATCATGATCGGCAGCGGGTGCACGCTGGGATCGCCTCGAGCACCACGCCGAGG
TCGTGCCCTCAGGTCGTGCCGCTGGATCTTCCGGTGCCCGACGCCAGAGCGCCGCGACGGCGCGCACGAGCAGCTCGGCAC
GCGTCATTTCCATTGACGCCACGATGACGGCGGCTCTCCGCCGCCAGCTCCGCGACGTATTCGCGAGCTGCTGCGCCCAA
GCGCTCTTGCCCTGGCCCGGGCGCGCCCGCGTACCAGAGCTGCCCGGGCTCATGCCATCGTGTGGTCTGTCGAGGCGTTG
GTAGCCCGTCGCCGTGCCACGTCGCTGTTTGCCGCCGCTCGTCCCACCCGGCTTGGATGGTAGCTCCGGCCCTCGG
CGTAAAGCGCCCGGATTGCCGGGCGCGACCCTCGCTCGCGGTGCCCGGTAGGCCCGCCGCTCGCACGTGTCGAGCCAGGC
GTCGACGTCGGGAAGCTCGCGCTTCGCGCCCTCGGCCGCGAGCTCGCGAAACCGGTTATCGCGCGCCGACGCGGGGCTAGG
TTCCGGATCGTTGAGCGTGCTGCTCGAGGTTGCCGTAGGGCTGCCCGGCTAGCGTCGCGAGGTACGTCGTGCCGCTACGGT
CTCGATGCGCTTACGGGACCGGAGCTCGCCGACGACGGCCGTGATGTCCACCGTGTGCCGCGGGCG

>13A-A3

TGCAGGTCAGATTGAATCGCAGATTAGCAACGGTTTTACGCTCTACAACCTCGTACGCATTCCGCAAGTCGATCGACTTCAAC
CCCAGCACCGCGGGCGCGAATAATTTAACGTCATCGATTCTCCCGCAACAAAGGACTCTCCGACTGGGACCGGCGCCACAT

CTATACCATGAGCGCGGTTTATGAGTTGCCTTTCGGGCAGGGCAAGCACTTTTTGACGAGCGGCCCTGGGAAGTGGATCCTGG
GCGGCTGGCAGCTTAACGCCCTGTGGAGCTGGGAGAGCGGGTTGCCCTGGATATCAGCACCAGCAACACCAGCTTGAACGC
ACCGGGTAATATCAATCGCCCGAACGTAAGTGGCCCGGTAAATATCCCCGGAGGTATTGGACCGGGGACGCTGTATTTTCGAC
AAGACGAAGTTTTTCGGCGCCCGCGCCAAATACCTTTGGCAACCTCGGCCGAAACGTCCTGCACGGGCCTGGTATATTCACCAT
CGACTCATCGATCTCCGACGATTCCCCATTCGGGAGCGGATGAACGTGGAGTTTCGCGCGGAAGCGTTTAACGTGACCAACA
CGCCGCAGTACAATCGGCCGGTTCAAGATTTACGAACGCTGCTTTTCGGTTCGGTGATAGCGGCCGAAACGGCACGCAGTCCGT
GCTGGTGAATAACAGCCGGGCGTTGCAGTTGAGCATGCGGGTGCAGTTCTAGGTTTCCTAGAA

>13A-H10

GTGCTTATAGGATTGCAGGGAAAAATTATCCGGTAGAAAAATTTGCCTGCATCTAATCTTGTTTTTTTAATTGATGTATCCGGG
TCAATGATGCAAGAAAATAAATTACCACTGTAAAAACTTCATTAATAATGCTTACTGATCAGCTTCGTGAAAATGATCACAT
TTCAATTGTTGTATATGCAGGCAATGCGGGGCTTGTACTACCGGCCACGGGTGGACGCGATAAAAATAAAAATTTAAACCGCT
ATTGATGCATTAGAGGCTGGTGGCTCAACTGCAGGAGGTGCAGGCATTGAGCTTGCGTATAAAAATTGCTCAGGAAAATTTAA
TGAAGGAAGGTAATAACCGCATCATTCTTTCAGCTGATGGCGACTTTAATATTGGTGCAGCAGCGACGATGATATGGTACG
ACTGATAGAAAAAGAACGCAACAAGGAATATTTCTTACGGTACTTGGTTATGGAATGGGAAATTACAAGGACAGTAAAATG
GAACAGCTTGCAGACAAAGGAAATGGCAATCACGAATATATTGATGGCATAAACGAAGCAAAGAAAGTTTTGGTAAATGAA
TTTGGTGGTACATTATTTACTATTGCAAAAAGATGTAAGCTGCAGGTTGAATTTAATCCTGCAAAAAGTTGCAGGTTACAGATT
GATTGGTTATGAAAACCGGTTATTAATAAAGAAGATTTTAATGACGATAAAAAAGATGCGCGT

>14A-B1

GCTGCGAGAAGAGGACGGTCCAGGCGCGGAGCCGCGCTACCTGATGCTGGAGACGGTCCGGGAATTCGGGCAGGAGCGCTT
GGCTACGGCCGGTGAGGAGGCCGCGCCCAAGACCGCCATGCGGGCTGGTGCCTGGCCTACGCGGACCAGGCGGGGACAGC
CCTCATCCCGATCGTCCACCCCAACGCCGTTGAAAAGTTGGAGGCTGAGCACCCCAACCTGCGTGCCGCGCTGGCGTGGCTGG
ACGGAGCAGACCGGGCGGGGATTGCTCGCGCTCGCCGCTGCACTCGGATTGTTCTGGTACCTCATAGGGCATTATCGGGAA
GGACTGGGCTGGCTGGAACGGGCACTCGCGGTCAGCCGAGATGATCGGGCCAGGGCGCACATCAAGGTGTTGTGCGATGCCG
GCACCCTGGCGCAGGCGCTGGATGCTCCCGTGGCGGCCACCTATCTGGAGCAGGCTCGCGCACTCGCGCGGACAACCGGCCA
GGTGGCCTACGAGGCAGAAGCATCACTCATGCTGGGCGTCATCGCCGAGGATCAGGGCGATTATGCGGGCGCCGAGACATTC
ATCACCGCAGCTCAAGAACTCTTTGAACAGACGAGCGATCCTTTCTCCCAATCGTCGCCGACTACCACTGGGGGTCGTCGC
CTATGGCCGGGAGACGTGGTGCAGGCGGCTTCCCTTCTGGAAGGGGCCCTCGCCGCCG

>14A-D8

GCGGATGGCGTCGGACGGGTCGAGGCCTTGCCAGAGTTTCGCGATCAGGTAGTCCAGAGGAGGATGACCGGCGTCGGCCCGA
ATGGATCTCCAGAAGAAGCTCCACGTTCCATTCATCAATAGGTCTGCAGGATCTCGTCCAGACCGTAGGAGAACCAGGTCGA
GCGCATGGAACGGATCGCCGCGCCACGACGGTGATCGTGATGAGCGGAGGCGCCACGTCCGGTCCAGAGATCGAAGTCA
CGCGGGTCGCTTCCGACCTGATACGTTCCCCGCGTGTGAACGTCGTATCTCAAGTTCTCCGCTTCTCGCTCGCCATCTGGATC
GGCGGGAGTGTACTCGTCGTCATCGCGGCGCCGTCGTTTTCCGGGCCGCTCTTCTCGGGACCAGGCCGGGGCCGCGTTCCG
GGAGATCCTGCGCCAGTTCGAGATCGTGAAGCAGCTCCTCTCGCTGCTTCTCGTCATCGGCGTCTTCGTCGAGCTCGAGCGAT
CCGGAAGGTTGGAGGGGCGGCCATCGTCTCGGGAATCGCGATCTTCGTCGCCGTCGCGACGAACGTGTATCTCGCGATGGT
GCTCCGTCGCGGATGAATTAATCTCCGCATGAAGGTGGCTCGTTCGACGCAGCGGGACCAGGACACCGTGGAGAAAGAAG
TTCGACCGGCTGCACCGCGGTCGAGCCGGGCTTTTCGCTGGGAGCCCTCGCGGCCGCGGTCGC

>14A-G5

CGCCCGAGCGCACGATCGCGAGCAGCGCCGCGAGCGTATCCGGTAGCTGCCCGGCTTCGATTCCCTGCCTTAGAAAGGC

TTCGATCTTATCGTGAACGTGAACGGCCTGATCGATCCGGGGACTCGTGCCCTTCACGTAGGCACCGATGTTGATGAGGTCCT
CGGCTTGC GCGTAGGTCGCCATCCACTCGCGGATCTGTCCGGCCTGGGCGAGATGCTCCTTTGTGCTCACCGCTCGCATCACG
CGTGACGTGGAGGCAAGGACGTGATCGCCGAAAGCGGTTTCGCTCGGGGATCCGGCGGAGAGGGGCGACGTGGCCATCG
AGAATCGAACGGGCGCGTCGGCGACCGGGTCATCCATGTCATCGCCTTCGACGAGAACGGAGTAAAGACCGGTGATGCTGC
CCTTACCGGGGCGCCATGCCCCGCGGTTCAAGGAGCTTTGGAAGTTTGGCGAAAACACTCGGGGTGTAGCCCTTCGACGCCGGT
GGCTCGCCATCGAAAGGCCGATCTCACGCTGGCCATGCAGAAGCGCGTGACCGAATCCATGAGCAGCAGTACATCCTTAC
CCTGATCGCGGAAGTGCTCGGGGATCGTGGTGGCGAGAAATGCGCCGCGAGCGCGAAGAAGCGGAGATTTGTCTGAGGTCGA
GACAACGATCACCGAGCGCTTCAAGCCCTCGGGTCCGAGGTCGTTCTCGATGAACTCGCGTACTT

>15A-A10

ATATCTCAAGCCACTGGAAAGCTCATAACAGGCTGCCCCCAGATATGCCAGAAAACTGGCTGGGCTTAATGCCACCACTC
AGCAGAGCCAGCCACAGTGTGGGATTGAACTGACCGTGAAGAAAAAACGCTGCTGACGGTTAGCTTTTGCTTTCGCGATGA
CCGCTTCCGCCAGCGATTTTTTCCAGGGAAAAATTGCACAGAAAGCGCCGACAGCTATCACTTAAAGCCGTCGTCCTTGCCA
ACAACCATAAACTCGCGCGCTGCTCGCTCGTCGCGGCCAGCGCGTCATTGAAAAACCGCAAAACGGTTCGGTTATGGTGAG
GGATATCCGATCCCAGTACGTGAATCAGTACAGTACATGCCCGCTACGCCAGAGTAAAAACACGCCACAACAAAGAGAAAA
ATAGACGATATAAGTTGCCATATATGCCTGCGCCGCGCCAGTGCACCATGCGCAGGGATTAGCCAGTGGGCAAATACCATC
AATAAAGTAACTGGCTGACTTCCGCCAGAATATAAAACCGCAGTGACGCTTTGGCGATACCAGATAACCAAAGACATAAG
CGCCACTTTTAAACACATCACCCACTAACTGCCAGGCAAAGAGATCGCGCATAGCGTAAATTTATTCGACAACAGCAGCCA
GATAGCAAAATCACGCAGCAGCCAGACGGTAAAACTCGCCGCGCCACTGCCGGTAAGACGAATTCAG

>15A-C3

CGGCAGCTCGATGCGATCCTGCGGGCGCTTCGGACCCGCGAGCGACGGGGTGATCGTCGACAAGTCGAGCGACAGCGTCTTC
GTGTAGTCGATCTGCCCCGCCACGGGCATGCCGAACAAACCCTGCGCCTTGAAATACGTCTCGAACGCGTCGACCTGCGCGTC
GGTGCCTCCGGTCGAGCGCAGGTAATCGACGGTCGCCGTGTCGACGGGAAGAAGCCCATCGTCGCGCCGTATTCGGGTGCC
ATGTTGCCGATCGTCGCGGATCGGGCACCGACAGCGTTCGGTGCCTTCGCCGTAGAACTCGACGAACTTGCCGACGACCTT
CTCCTTGCGCAGCATTTCCGTGACGGTGAGCACGAGATCGGTGCGCGCTTCGGGAGGCGTCCCTTCAGCTCGACGC
CGACGACGTCGGGCGTCAGGATGTAGACAGGCTGGCCAAGCATGCCGGCTTCGCCCTCGATGCCGCCGACACCCCAACCGAC
GACGCCGATGCCGTTGATCATCGTCGTGTGGCTGTCGGTTCGACGAGCGTGTGCGGATAGTAGGTGCCGGCCTTGCAGTGCA
CGCCGGGTGCGAGGAACTCGAGGTTACCTGGTGGACGATGCCGATGCCGGCGGCACGACCTTGAACGTATCGAACGCCTG
CATTCCCCATTTATGAACTGGTAGCGCTCGGCATTGCGCCGGAATTCGAGCTTCATGTTGAG

>15A-E10

TCTTCGACATGCGAGGAGTATGATCCAAAGCAAATGAGTGGAATCACTTCCTCCTATGTCAACAACCAGATCTTCGTCTA
CAGCAAGTGTATTGATGGAAAACCTGTTGTTGTGGTGAAGGAATAGTGGCTCTCTTTCAACGTGCGAAGTGTATGATCCT
CAGACGAAGCAATGGAAAGAGTTTCCCTCTTATCAACCGAGAGAACTGGATGTTATCAGCTCTATTGAATGGTCAACTAAT
AGTATGTGGTGAAGTGTAGTGTAGTTCTTTCTCTTTCATGCGAAGCATAACGATGCAAGGAGTAATCAATGGAGAGCCTTTC
GTTCTATGTCAACAAAGAGTACCAGTTCGACGAGTGTATTGTAATGAACACTATTGCGCTTGTGGTGAATAAAGCTGACT
AGGTTGAGGAGCAATTTGGACATAACTATTAGTAAAAAATAGTTTGAATTACATATTAACACTTTCTTCGTCTCACTCGA
TGTTATTTTATCAATAAATAGCAAAGTTGACTCAACTTGTTTGAATCACCGTAGGACCAGGAATTCGCTGCTTTTCATAA
GTTTGAAGCTTCTCCCTAACTTCAATGACATTTTCGCTATCAATCCAGTCAGTTTCGTAAGAGGAAGTGCAGCTCTGGGTT
ACTTTTGACCATTGCAGTACTTGGCTAACAGGAATGAGGTGTGGTAAAAGTGCTT

>16A-E5

CATTAACGGCGACCTGGTCGCGCCGCGGCTTCCACCTTCCCAGCCAGTATGAGGAGGTGATCGTCAAGCCGATCCGCAAAC
GAACGCAGATCTGATCATGGAGGAATGGGATAACCTCCTGCTGCTCGCGCTCGTGGCCGCTGGTCGCAGTGGGATTGGCGAT
AGCCAGGTGAAGAGAACTTACCCGGGGGAAACGTTTCTCCCTGCTGCGGCAGGACGTTTACGCATACAGTAGACCAAAGCA
GGCGCCAGGGTCATCGAATCGATCGATGGAGCATCTGACTCGCCTGCTCTACCTCGCGCCGAGCGTCATCGAGCGCAAGGGC
GAGGAACACAAGGGAGGTGAGCGTCGATGCGTATCACCATGCAACCCGGCCTGTGTGCTACAAGCTATAGCACGACAGGGG
CATCATTCTGTGAGAGTTGCTTCGCCACGTTTATGATGCACGGCTGCTATCCTGACCGCGCTGCATCCTGGAGGTGCTCGAC
GGCGACCGAGACGAGATCAGCTCGTGTGCGCCGCGATGGAGGGGAGGAGATCGTGAAATCACCGACGAGAATCGGGCA
GCACTGGCCTTTGGGGAACGCAAGGGATTCAAGTAGCAGTATCCGAACGCCGCTGATTCAATGGACGTCATCCTGGCAGTCT
GGCAAGCGACCGAGCTCCAGCAGGCAGGCCAAACTGATGGAGCTCTCCGGACAACCTCGTTGTGCGAA

>17A-D12

TCAGGCCCTGCTGCGGAATCCGCTGGCTGATCCTTATGTACTGGGCGTTTCGAGCGGTGCGGCTCTTGGCTCGATCCTTGCCT
GATCATCGCGCCGGGCTTTGCGCTGGTACGCCAGTTGGCGGTTTATTGGAGCCGGCGCAACGATCGCGGGAGTTATTTTC
TGGGTGCGCGCAAGGCCAGCTCGACAGCACGACGCTATTGCTTGGCGGCATCATCTGCGCATCATTTTTTCCGCCATCATC
ATGTTTCTGATGACGACGCTTGCCGGTTCGAGACCTGCGCGCATGGTTTTCTGGCTCATGGGGATTTATCGACGCCGTTTCC
GCCGAATGCAAGTGGATTTTACGGTGGGCTTCTTGTGTCATTGGCGCGATCTACAGCACCTCCGCCGACTGAATTTGTT
GCTGACGGGTGAGCGCAAGCCATTCACCTGGGAGTGGACGTGACGCGCTCAAGCTTGTGTCTACGTTTGCCTGCTGCTTC
TGACGGCGCTGGCGGTTTCGGCCAGCGCGCCATCGGCTACGTTGGTTTGTGTCACACGCGGTACGACTGATTTTCGGA
TCGGATTACCGCTGCTGATTCCGGCTGCTGATTGTGCGGCGCAATCGCCATCGTTATGGCCGATACGCTGGCGCGCAAT
CGTGCCGCCGACGGAGTTACCGGTTGGGGCAATGACCGCCATGGCCGTTGCGCCGATT

>17A-E7

GCCGAGCGGATCGCAGTCTTACGAAAAAGTCGTCTCGCTCGAGGAGGCCGCTCCCTTGTCAAAGATGGCGAGACGGTGG
GCATCGGCGGCAGCACGCTGTCGCGCACGCCGATGGCGATGATCTTTGCGTTGATTCGCGCGGGCCGAAAGCGACTGTCGTG
CGCGCGCGCATCGTCTCGAGCGAAGGGCAGCTCCTGTTGCGCTCAGGCGTCAGCAATCACATCGTGACGAGCTGGTTCAGC
CAGGGCATCGTGTGGGCATCTCGAAAGTATGCGCCATCACGTCGAGCGCCGCAAGGCGCGTTCGACGAGTGGAGCCACA
TGGCGATGGGACTGCGCTTTCGCGCCGGCGCAATGGGCTGCTTTCCTGCCGATGCGATCGATGCTGGGCTCCGACGTTTTG
CGCGAGCGACCCGAGCCGCGGAAATGGCGTGCCGTTACCCGAGAAAAGCTGCTGCTGTCGCGGCGCTCAATCCCAGTG
TCGCCATCATCCAGCTCCAGCGCTGCGACGCGTATGAAACGCGCAGATCGATGGCTGCGATTATGGACATCGATCTTGCA
ATGGCCGCAATCGCGTGATCCTGACCACCGAGCGAATTGTTTCCAACGACCAGATCCGGCGCGCTCCTGACCAGACAAAA
TCCGTTCTTCGCCGTCGAGGAGTGGTGGAAGTTCCCTTCGGCTGCGCTCCGCACGAATGCGGT

>17A-G1

CAGCGGATGACCGGCGTATCGTCGGGCGCCCGGATGCGTCTTTGCGGGATCGTGCTTGGCCGATGACGCCTTCGCGGCGC
CTTTGCCCCCTTTCGATCGCGCAGTACGGGCTGATTTTTTGAATGGCCGCTTTAGCCGCGGTTTTGGCTGACTTATCAGGCA
ATTTATCGTTCTTCGGCATTTCCTGCTTTGAATTTCCGAGTGTTCGGGCGCAAGACTACATTGTTCCAGATAGCCGCGATAC
GACCGGGCGGGCAGCATTTCGCTTTCCCTTCAGAGAGTTAAACGCGGCCCTTTGCACTCCTTTGCACTCCTATGCACTCCTA
TGCACCCCTGTGCACGCTGTCACCGACGCGTACCAAATGGTGTGTTGCTCTCGACCTTCTCCGGCAGAAAGTGAAAACCTC
AAATGCGCCTCGACCGATTCCCCGAAGACGCGCGAGGTTCCATGGCCGTTGAGCTTCCCGCCAGTGACGAAGAAAAAGCCGC
CCGCAACGTGATCGAACTCGCGGGCGCGCACTGGCGCGCGTGCAGCGACATCCCGGGCACGTTTCGTCGCGCAGCTTTAC
GGTCGATGCGTGCCGAGGATGTCGTGCGCTACGGCGCCGACGACATCGTCGCGCTGGCCGAGCGCGCCTACGATTTTCTGTC

GGAGCGCACGCCGGGCACGCCGAAGATCCGTTGCGAGACCGTGCCGCTTGTGCC

>18A-A7

CGCTTCCACCTGGGCATCGGAATGGGGTTCAAACGCCGCGAGTGTCTGGCCAGTGGACGGATTGACGCTGACGATCGATTTC
ATACTTTACTTTACAGGGAGGGGCGAGCTCCGCGAGTCCCATTTTGGCCGGCGAAAAAATAAGACTCGCTGGAGCTCGTCCCT
CGCTACAGCTTTTTCAATTGGATATTCTTGATCGACGAACTTGTACAAAACTCGCGACTCCAAGAGGGCGACGAAAGGAAAAT
GTCGCCGAACCGCAGTGAGATTTTTTGCCTTCAAATCGACATCATAAACCTGGTCCGGTGTCCACCCAGCCCTGGAGGTGGT
TGTGGCCAGTCGCACTCGCACGTGATACCAGCGGTTCCGGTTCGAAATAGAGAACTTCGTGGTTTCGTTTTCCGAGGGCTCG
ACGCCGTTGATACAGATAAGCCTGTGATGCTTCCACCCAGCCCCGAGGACCATCGTACCGAATGAATCGTTCACGGGAA
AAGTCAGGGCGAAAAAGAAATCGCTCCCCTGACGTTTCATGGCGTCGAGCGAAATCTCGTAATTGTTCTTCGGAAGCGACGA
GGGGTTATTGGTCCAGGTGATGCCAGTGAGCGGATCGCCCTGCCGAGACGTATCGCACCATCCTTACATCCACCGTGGCGT
GACCCGCGAACTCGGTGACCGCCCAATTTTGAACGATACGCCATCAAAAAGATTTCGTTGCACC

>18A-B3

ATTCTTGGTGGCAATCTGTGCTGCCGACCGAGTATCCAGTTTACGCCAAAGCCGCTAAACTTATCGCTCATTGCGCCGGAACC
ACTGCCGCTCGCCTGAAAAAGAACATCTTCATTCCCCTTCCAAGCAGCGCTCCACAACCGCGTCTTGTGCTGGCACAGCCGG
TCTTTTGGCCCTCTCACACAAGCGGCATGATTCTCTACCAGCAGCTGGCAGTGCAAAGGACACCACACTGGTCTGGTGCGGG
GCTTCGTTGACCATGTGGCACTGCAGTGCAAGAACGACAAGGTTAGTGGGGAGCGCGCTCGACGGTCAAGATGATCCACAC
GTGCTGTCAAGAGGTCGGCGGGTTTAGCATGGTGGAGCTGCACCGCGGACGGAGGCCAAGATAGACAAGCATGTACAGTTT
GAGGCACTGTTCCAGACAAATCACTAAAGTAACCCTCGTCGTATAGAGACTGCCCTGCGAGGTGGGGGTTTCGGATAT
AGGGCGTCGGGATTTCTGGGTAGGTACCGAGACTACAACAACAATATCAAACAGAGGGTCAGGGCGGCACTGCTGACGACT
GCGGCCGGGTCTTCTCGTATTGTTGAACTTGGTGTAGTCAACCTCGTAAACCCCGCGCTGGTCTGCGTTGCGGAGGAGGGG
GAAGGAGGCTTGAGCGTGAAAGCAGGTTCAACAACAGCGGTACCAGGGACACGATATC

>18A-C12

GGCGACAAAATCCTCGGTTCCGCCAACTGGGTCAAATCGCCCGACGGCAAAAAGAATTGGATCCTCACCGGCAGCTACGATT
TCAAACCTTATTCCGTGGACGCCACCACCGGCAAAACGAATTGGTTTTTCGAAAGCGGAAATTACATCAACGGCGCGCCGGC
GGTCGCAGACGGCAAAACAGTCTTCGGCGGATGCGATGCATTGCTTCACGTCATCAATTTGAAAGACGGCACAAAAGAAAA
GAAGTCGAAGCCGGCGCTTACATCGCGGGCTCGGGCGGTTTCGAGAAAGGCAAATTTACATCGGCCATTATGAAAACGAAT
TTCTATGCGCCGATCTCAACGAAGGCAAAATCGCCTGGAAATTTACGATCGCAATTTCCCTTACTACTCTCGCCCGCGCTC
ACCGTGATCGCGTGATCTTCGGTTGCCGCGATAAAAAATTACATTGTTGAATCGAAACGACGGCCAGGAAGTCTGGAGTTT
TAGCGCGCGCGGCAAAGTGGACAGCTCGCCCGTGGTCCGCGGACAAAATCGTCGTTGGCTCCGATGACGGCCGCTCTAC
ATGGTCGCGCTCCCGATGGCAAGGAGCTTTGGAATTTGAAATCGGTCAACCCATCACCGCTTCGCCCGCGTGGCTGGCGG
CCGTGTTTACATTGGAAGCGAAGATGGGAACCTTTATTGTTTCGGCCCCGCGCC

>18A-E8

CACCGAGCTCGTGCAGATTGCGGGTCGTTACGCTTACGCTGAGAGGAATTTGCTGACCCTTCTCGACTTCGGACGGCGAGT
TGTGCGCGAGCGTGACGGGCGGACCGGGCGCTTCTGCTCTTGCACGAGACCGGGCTTGCCATCCGCTTCCACTTCGTCTTT
GCCGTGTTGAAGAAATCGCGAAAACGCGGCGACTCGCTCGGCGGACGGAATATTCGGGATCGATCGCGAAGAGCCCGCGC
GCTGCGCTCTCGGCCTCTTCTTTGCGATTACGCTGATGTAGTTGTAAGCGAGCAGGCGATAGACCTCGATCTTCTGCTCCTC
GAGTTGTTTCGGACGAAGCAGCGCCGCGGACAACGTTTGGATCGACTTTCGTATTGCTGATCGTCAAGAGATTTTTCCGCG
CGTGATGAGGTCTTGTGACCCGCGGGCTGCGCGCCGCTCCGCGCTGTTGCGCGTAAACGACCGGCGACGACAAGACGATC
GCGTTCGCGGTGGCGATGAGCGCGAGCGCAGAGATCGGGCTCGCAAGCGAGCGAAAAGCATGGCGGAAGGCTAGCTGAA

AACGAAGTTCAGCCCTTGGTTTTTCCGCGTACATGCGTCGAGCGGGCTCGAAAACCAGCAATTTTTTCGCGATCCGCGGGCGCG
TCGCGGGATCGTTTCGTTCTCGCCAGCACGAGCGCCGCGAGACGACCGCCGTACACGCATCC

>18A-H2

AACTCTCTCGATGTCCTTGGGAAGGATGAGGCCGAGGCAGTCGGCAAATTATTAGGCGCAGATCGAGTTTTTTGGGGCAGCTT
CGAATCAGTGACCGGAAAATATTCTGCTAATATCCAAATCCTAAATGTTGCTTCCGGAAAAATTTCTGGAAAGGCTAGTGCAT
ATTCGCCGATCTGTATGAACTCTCTACTTGTCTTGCCGAAAGGGTCTGGGAGAACTAAATGTTAAGGAGATAAAGCGAGA
AGGTAATCTAAGACTAATCGGCTGGAGCATGTCGCCTGGCGCGTTAGACCATTTTGGCAAAGGCAAAAATCTTTTAGCAGAG
GAAAAGCGCGAAGAGGCATGCTGGGAATTTAGGAAATCAATCGAGATTGATCCGCTTTTTGAAGAGGGCGAAAACGTTCTCG
CACAAGCCTTGGCGGACGAGTCGAAATGGGATGAGGCTGGGAACTGGCGGAATCAATTGTAAATCTGCAGCCATCCAATAC
TTCGGCAAGAGAGCTTTTTGGCGTTTATCTTTGGATTCTGTGGCAGAAATGAGGAATCCGAGGCGGAACTGAGAACGGCTCTCA
AATTCGACCCGGACAATGCCAATGTTTTAACTCGACTGGGGTATCTTTATTTTTTTGAACAAAGATTTGAAGAAGCTGTTGCG
GCGTACCAGAGTGCACCTGCGGTTGGAGCCATATGGTCCGACCGCCTGTTCTAGTCACGCGCAGCT

>19A-A4

CGCACTGAAAATGCGTGTGCGGCGTGATCGAGCCCGCGCCCAATACCTGGCCGCGCTCCACTTCTCCCGCTTGGTGCCG
CGCAACAGGACGCCGATATTGTCGCCCCGCTCGCCCTGGTCCAAGAGCTTCCGGAACATCTCGACCCCGGTGCGCACCGTCTT
GGTGGTGGCCGAGGCCACAATCTCCACTTCGTCGCGGACTTTGACGATGCCGCGCTCGACCCGCGCGGTACCACCGTGC
CGCGCCCCGAGATCGTAAACACATCTCGATCGGCATCAGGAACGCGCCGTCCTTGGCGCGCTCCGGCTGCGGGATATAGGC
GTCGACCGCATCCATCAATCTGGATCGACTTGGCGCCGGTCTCCGGTCTTGCCTTCGAGGGCCGCAAGGCCGACCCCT
TGACCACCGGGATGTCGTCGCCCCGAAAGCCGTAGGACGACAAAAGCTCGCGCATCTCCAATTCGACCAGCTCGATCAGCTC
CGGGTCTCCACCATGTCGATCTTGTTCATGTAGACGACCAGCGAAGGGACGCCGACCTGGCGGGCAACAGGATATGCTCG
CGGGTCTGCGGCATCGGCCGTCGCGCGCCGAGACCACCAGGATCGCGCCATCCATCTGCGCCGCCCCGGTGATCATGTTCTT
GATGTAATCGGCATGGCCCGGCAATCGACATGCGCGTAATGCCGCTTCGCCGCTCTCGTAC

>19A-G7

CGTGACCTCAATCGTGAATCTTCCAACCTGGGTGCGGGTCTTACGGGCGTGCATGAATACCCGCCGGGCCACGTGCTGGATG
CGGTGCTCGACCCGAATAATGTCTTCGTGTTTCGATGCCGCCGGCCGTCTGGTTCGCGGCCCCGGGCTCGGGCTGAGGAAGATGC
AGCATGGCCCGCATTGACCTCGTCGATCTTGCACCTCTACAGCGGCAACAGCGCGGCTCTCGAATCCTTTGCGCTCAAGCC
TGTCACGATGACCTGGCGCAGGGTGGGGCCTATGCACTGCTCGGGCCATCGGGGTGCGGCAAGACCACGCTGCTCAATCTG
ATCTCGGGCATCGTACCCCCCTCGCGCGAAAAATCCTGTTGACGGCGTCGATATACCCCGCTGTGACCCAGAAAACGCAA
TATCGCGCAAGTGTCCAGTTCGGGTGATCTACGACCCATGACGGTCGGACAAAATCTGGCGTTTCCGCTGAAAAATCGCG
GCGTGCCGAAGCAGGAGATCGACGCGGGGTGGCGGAGATCGCGCGCCTGCTCGACCTACGCCCTATCTTGAACGCAAGGC
GACGCGACTGACGGCAGATGCCAAGCAGAAAATCTCGCTCGGCCGGGATTGGTCCGGTCCGACGTCGCTGCGATTCTGTTC
GACGAGCCGCTGACGGTATCGACCCGAGCTGAAGTGGCAGTTGCGGTCCAAGTTGAAGGCGCT

>20A-B10

TAAATTCTAACCATCCGCTTCTCACAACCTAATACCATGAAAACAACACTCCTTATTATCACTGCAACGCTGGGCCTCACCC
TCGGGCAAGCTCACGCCGATCGTCTTGTTCATCAAAGGTTCCGATACGCTCGCGCCAAGCTCATCCCTCAGTTGGCCGAAGCT
TTTAAGGCTAAGAGTCCCGCACACCTTCGATATTGCAGCCGAAGGTTCCACCACCGGCATCGCTGCCATCATCGATGGCAC
GGCGCAGATCGGGATGGCCAGCCGCGCGCAAACCTTCCGAAGTCGGCGCAGCTTCGGGCAAGGGAGTGAATATGAAACC
GACGATTGTCGCTTACGATGGGATCGCGGTTATCGTGAATTCGGCAATCCGATAAAGGGACTACCAAGAAAACAGGTCGAG
CAGATCTTACCGCGATGTCATCGACTGGAGCGCCGTGGGTGGCAATCCTGCGCAGATCTCGGTCTACACCCGTAACACGTC

ATCAGGCACCTACTCTGACTTTAAGGAACTGGCGATGAAGAAACGCGACTACGCTTCCAGCGGACAGAAAATGGCAGGTAAC
GAGCAGATCGCCTCTGAAGTCAGTAAGAACGCCAACGGCATTGGCTATGTCGGCCTGGCCTACACCAAGGCGAGTGGAATCA
AAGTCGTGGCGATTGATGGCGCAGTTCGGTCGGTCAAAAGCGTGCAGGCCAAAACCTACCCCTATG

>20A-D2

GGCGTCGAGGTCTCTGTTTCTCTCTGCTGCTCACCACCCTCAACATCCGCGGGCTGCGGGAATCGGTGCTCGCGCTGCTGCCGCT
CTTCTGCTCTTCTCTGTCACCCACGCACTGGTGATCGGGCGGCGGTCATCGGCCATTTGCCGCAACTCTCCGGAACGGTGC
CCGGCGTGCAGAGAGCTACGCCCGGGCACATCACTCCTCGGGATGGGCGGACTGGCGCTCTCTTCTCCGGGCCTACAG
CCTGGGCGGGGACCTACACCGGGATCGAGGCGGTGTCGAACGGGCTGCCCGTGATGCGCGAGCCGAGGGTGCAAACCGG
CAAGCGCACGATGGCCTACATGGCGTTCTCGCTGGCCATCACCGCCAGCGGCCTGCTTCTGCTACCTGCTCTGGCAGGTCA
CGCCGGTCGCGGAAAGACGATGAACGCAGTGTGGTCGAGCGCATACGAATGGCCTCCCTTCGGGCACGCCTTCTCGGT
GGTGACGCTCTTACCGAGGGTGCCTGCTGGTGGTCGCCGACAGGCGGGATTCTCGATGGGCCGCGGGTGTGGCCAAC
ATGGCGGTGCACAGCTGGGCGCCGATCGCTTCGCTCGCTCTCCGAGCGCCTGACCACCAAGAACGGCATTCTCTGATGGG
CGGAGCGGCGCTGATCGCGCTGCTGTACACCCGCGCAATGTGGGTCACTGATCGTGATGTACTCG

>20A-F5

TTTGC AACGTTGAGCGAGTCAGTTCGTCCGATTGGAACGGAAGGCCGCAATTTTTGTTGGGGCACGCCCCGGATGACAAAT
CAAAAATTGAAGCGCTCGCAAGTGCAAGTAACCGGGCAACTGGAAGATTCTGAAGGAGGCAAGCGGACGCGATTGGT
CGGTGAAGTTTGTGGCGAAAGACGGAATTCGCGGAGCGGTGGTGTGCTCTGACACAGCAAAATCAACTGAATCGTTCAA
AGATGACCCGCTGATTCAGCAAGCCATCGAACTGTTTAAGGCCAGGTGAGGTCCTGACGCCATGCGGTCTCTTTGTATCCT
GAGCGGAACGAAGCCAAGTCGAAACATCTCTCGATGTTTATCTTCAAGCGAGAGATTCTCGACGCAGCTTGTCTGAGTGA
AGTCGAAGGACTCGGAATGACAAAGCGTAATCTAAACCATGAATCTAAATAAATTGATGAAGCAGGCTCAGAAGATGCAGG
AGCAGATGACGAAAACGCAGGCTGAGCTTGAGAAACAACTATCGAAGTAAGCGCAGGTGGCGGGAAGGTGAAGATAACAG
CCAATGGCGCGGGAGACATCATTGGGATCAAGATTGACAAAGAAGTCGTGACCCGAATGACGTGCAATTTCTCGAAGAAGT
GATCCTCAGCGGCGTGAACAGGCTGTGCAACAAGGCAAGGCGCTCGCGCAATCTGAAATGAGCAGGAT

>21A-A5

AGGAACTTTTTGGTGTGACCTTCGAAAATATATGGTGTGCGCCGAGTGACCATCTTCGGCGCCGTGGGAGATACGCTGCT
CTCCACGGAATGAAAGAAGTCGGCCCCATTTCTTTCATCGTTTGGCCAAAATTTCTAGTCATTTGGACCCCTGGGTGCG
GCTGGGAATTCTTTCTATTGGGATTTTTAGCGCCTATATG

GTAAGCTCTCCTGGGCTGATCTGACCTACGTGCTGCCGCAACTTCGTTGGGATATGTTGTGCTGGCGTTGATCGCAAAATC
GCACTGCACGAAGAGGTGAGCCTTAGCCGCTGGCTGGGATTCTGCTGATCTCAGCCGGGTGGGGTTCGTCACCCGAGGCC
CAGCGTTAACGCATCCGCCAAAGCTGAGAAGGTCAATCCAGAGCCTGTGGGCAGCAGGGGACGCTATTGAGCCACCACGCC
TATACCTGGGGGGCATTACAGCGATCGTTCTAGCCTCGACGACCGGCGACGTACTGCTGTGCGGTGCCATGAAGCAGGTGG
GAGATGTAGCCAGGTCTGGCGGCAGCATGGATTGCTCAAAGTCGCGGGCCGATTTTGGCAATCCGAATTTCTTCTCGGG
CTCACCGCATGGCAGTGGCCTTTATAGTTTACTTGGCGCTTTCCTGGGCGGATGTCAGCCTGGTGGCTCCGGCCTCGGCA
TCGCTGACATTC

>21A-D1

GCGCTCGACGCCGGGCGAGCTCACTTCCATGGTGTACCGTCCGCCTGGAATCACATCTTCTACGTCCAGGATGGTGCCACGT
TTTGCGTGATGTACTCGCAATCGGCATGCGTTACGCCTTCCGGCTTGTCTATGAAAATGCGCAAAACACGGGTACCGCCGCCG
CCCAGCATCTGGACATCGACGACTTCCAGCGCCTTATCGGCGCCGACGCGTTCGGTTATTTCCCGCACTTTTCTACGATGGTC
GCCCGTCCGCCATGTTTCAGTTCCCGACCCATCACTCGCCTCAAGCAAGGAATCCGAGCAATAAAAAAGTGGGCTTTCGCC

ACTGCCACTGCTCGTCCCTAGAACCTAGTATACACCCTTGTTAAAACGGCCCTCGCGAACGGTGGGCGCGTAGGGCATAGCA
ACAAAACGAACCCAGGAACCTGCTGAAACCAATGGGACGGACATCCTCGTTCCGGCGTTCTGGTCACGCTCTTAGGGTTCTTG
AAAATTTGTAGACCCGGCCAATCGGGGTATGCCGGTGGCTCGCCTCTGGCGCCGTAACGCAGTCCCGCCCTCCGCGTCCAC
ACCCGATGAGGTTTCACGAAGTACTTAAAGCGATGAAAAGGCCGCTGATCGCGTTATCCGCGTGTGGCCGTAGCTCTATCC
GGATTGCGCCGCTAGGCGGTTCCGAAGGATCGGTAACGTCCGACCAGGTCAAATT

>21A-E11

TCTGAACAAACGGCCCCGCGCTCCCGCTTATTCTGTGCTCGCCGCGCCCGCCGTTATAATCCCGCCATGAAACACCTC
GCGCTGTGCTGCTGTTACTCGCCGCCACCAGCTCCGCGCAGATCCCGCGCTCAAAGTTGTCATGTTTTCCGGCTCC
TCCGAATACAACCTCCGCCGATTCCCTCAACGACTTCAAAAAGCTCTTGAAAAAGACCACCCTGCCAGTGCACCGTCAACAT
CGTCGAAGAAAAAGGCACCCTCTACCCGGCATCAAGGCCCTCGAAACCGCCGATGTTGCCGTCTTCTCACCCGCCGCTCA
GCCTCTCCGATGATCAAAATCGCCAAAGTCAAAAACCTTCATCAAAGCCGGCAAAGGCGTTGTGCGCATCCGCACCGCAAGCCA
CGGCTTCCAGACCTGGCTGGGCTTTGACCCCGAAATACTAGGCGGTTCTTACAACAACCACTACGGCAAAGACGTCCCGCCG
ACGTCTCCATTGAGGAAAAAGCAAAAGACCACCCATCCTCAGAGGCGTCACGCCCTTCGTACACCCGGCAAACTCTACAA
AAATCCCAAAATCGCCGAAGACGCGACAATTCTTCTCCGCGCAAAAACCCCGATTACGGCGAACCCGTCGCGTGGGCGCGC
GAAGGAAAACCGGGCGAACGAGGCCGAGTCTTTTACACCTCATTAGGCACCCCAAGA

>21A-F7

GCGGCAATCTGTATCGGAACCGACATTGGCCTGCACGGCGCGCACCTGCGCGCCTGTCTGGCGCACGGCATCCGCGACCGCC
TCGGCCTCTTTCGCGCTTTTGTGTAATTGATCACACATCGGCGCCACGTCTGGCGAGCCCGAGTGCACACTTGCGCCAAT
CCCCGACGAGGATCCCGTAACAATTGCAACCAGGCCCTTGAGGTCTTCTGTTCATCATCCCCGCCTTATGCTTGTGTCCCG
ATTGGGATAATCGTATCCGACACGCGGACGCTGCAAGGAGCCGCCATTTCCGCTCAACCACGACCCATGGACCGCCCTGAG
CAAGGCGCTTGCGCCATGCGGATCATCTGATCCGCCATGGCCGTCCCGCATCGAGACCGCGCCGCGCACCAATCATCACG
GCTCCGCTCCTATATCGACACTACGACCAGGCGGGTCTCGATCCCGGAGCGTGCCGCGGAGGAGCTGCAGGATCTCGTC
AAGGAACTGACGGCCGTGTTACCAGCGCCGCGCACGCGCACATGAAAGCGCGAAGGTGCTGGCGCCGAAAGCCGAACTG
ATCGCCGATCCGCTGTTCGCCGAGGCGCCGCTCGCAAGCCCGCGCATTCCGCTCTTGGCGATGAAGGTCCCAAAATGGGCCGT
GGTCGCGCCTTACTTTGGCACGCCGTTATCGTCCCGGATCGAGGGCTACACGAAAGCCAGA

>22A-B8

TGAACCACTTACGATTCTATGGCCGGAACGGATGCCGGCCCTGGAGAGACTCGCGTCATGAAAGCGCAGAACCCTTCGAAA
ATCGCTGAGCAGGGGAAGTGGCACTTACCCCTTCCCCTGCACCCCATCC

>22A-H3

TCCATCGACTTGGGCTTTGAGACAAGAACTGTTGTATCAGGAATTGCAGAGTTTTTTAAACCCGAAGAAATTATTGGCTTGCA
GGTTTCGGTAGTGGCTAATCTGGCTCCTCGTAAGTTAAGGGGGATTGAGTCGAGAGGGATGATTCTGATGGCAGAAGATGAA
GCCGTAAACTCCATTTTCGTATTACCAAAAAGATTTAACATCAAACGGCAGTATCATTAAATAAAAAGTTTTACTTTCGGTAACT
TATTCTTCATCTAAAAACAAGTATGAAAAAGATTTTTTACTCAATGGTTATGTTGATGTTATCGGCATCGCAGATTTTTGCTC
AATGCGGTGCGGTTATCACGATATGATTTTTTCGAATGTAACCTACCCTTTAAATGTTACCTATTCCACTTCAAATGGAAC
CGCTTAACTTGATGTTTATCAACCCACAGGTGATACTGCTTCTATGCGCCCTTGTTATTATGGCGCATGGCGGAAGTTTTA
TTGGTGGCGATAAGAACGAAAGTGTATGCGCGACCATTTGCACTAACTTTGCTAAACGCGGTTATGATGTGCTTCAATCAAT
TACCGTTTGGGGAATGCGCTGGCGATGTTGGATTACGCAATGCCATCACAACCGTTATGAAAGCCATCAGCGATGGTAAATC
GGCTATTCGTTTTTTCAGACAGGATGCAGCCAATGCAAACACGTATAAAATTGACC

>23A-A2

GCGGAGGAATTGAGGATCTGGATCCCGACCAGCTTCTTCGAAGCGGACGGGCCGACCACTACAACAGCCTCGCGATGATCG
GCCCCGACGGCAAGGTGCGGGCGTTTATCGCAAGAGCCACATCCCCGACGGGCCGGATACGAGGAGAAATTCTACTTCCG
GCCGGCAATACCGGATTCAAGGTGTGGGGCGGCCGACAAGACGACGCTCGGCGTCGGCGTTTGTGGGACCAATGGTAC
CCCGAAACGGCGCGCGATGATGCTGATGGGCGCCGACATCTGTCTATCCGACCGCGATCGGAACCGAGCCCCACGATC
CCGACCTCGACACCAGCCGCTGTGGCGACGGCGATGATCGGCCATGCGGTCTCGAATGTCGTGCCGGTGGTCGCCGCCAA
CCGCATCGGGACCGAGCACGGCCAACGCTTCTACGGCCACAGCTTCATCTGCGATGAGCGGGCGACATCTCGCCGAGTTT
GGAGCGAAGGAAACTGGCGTACTGGTCGCGACGCTGGACCTCGCGGGCGCAAAGAAGCACCGCGCGGCTTTGGTTTCTTCC
GGGACCGCCGGCCAGAGCTTACGGACGGCTCACCGAGGACGTCTGAGCGGACCGCGCGTTCGAACACGCTTTCGAACATC
GCCGCGTCGAGGCGGCCGGTATTCTGGTTGTAGCGTGAGCAGTGATAACTCGACAGCAGCACTCGG

>23A-C7

CGCTCAAGATCGGAATGCCGGCGAGCACGTTGCTTCTGAAACAAGCAGGCAGAGTCCGCCCCGCAAGCCGCGGCAGCGGG
GAAGCGTGTGCGGAGAGCGAGGAAGCCTTTATCGCCGAGCGCCTGCACCGTGACCGGGGCCGATGCGTCGACTCCAAGCTC
GATCTGAAACGATTGTCCACAATGCCCGTTGCCCGCAGAAAGCTCGATCACAGGAGACCGCTTGCCCTCATCTCGCGGA
AGATACCGAGCCGGCCGGACAGAGGCTCGATCCAGCAGCGCCGAGCGTTTGCCTGGTGCCGGATGCTTCGCGAGCGAAGC
GAGCAACGCTTCGAGCTTGAAAGCTGTAGCGGCTCTCGCCACCGCCACCGAGGCATGAGGCGCGGAGCGCGCGCAGC
GCGATCTCTGCGGTGCCTTGAGCAGCGGCCCTGGTCGACCGTTGCGTAGCCCGCTCGTCTGTTGCTGCTGCCTTCGAG
GAAATTATCAGCCGCGTGGTCGAGCGCCTCGCGCGCGCCTCAAGCGACGCGCCGAAAGCGCCAGCGCCTTTTGCCTGAGA
CCGAGCGCATCGAGCGCGCTCGCAGCTCCCCACCCGCACACGTTTCAAGCGTTGATCGGCGTTGTTGCGATCGGTGACGAA
ACCGATTTGCCGGGCCGCAAGCGCGGGCGATGAGCCGCGCCTTGGGCAGTTCGAGCAGAGGCCGATG

>23A-D4

CTGACCGTCTCCTTGTGGCCTCGACCCAGGCGGTCTGCATGTAAAGCGACGCGGGGGATAGGTGCCGCCGAGCGCCGCTT
TGGTCCCCTCGATGGTGCGCATATCGACGAGCACCGTGGCATCGCCCGCTTGATGAGACGGGTGATGGTGGGCTCGGTGCTC
ATGCCCGCTGAATTTGTCTGCTGCATGGCGGCGATGAAGGTATTGCCCGCCCCACCAGCACCAGGAAAGTCAAATCACCGAG
TTTACGCGCTTCTTACTGCCAGATACTGGGTGAGGAAGTTGGTCGAGGAGCCAAGTCCCGTGACGCCAGGCTCATGCCCT
TGAAATCGGCGGGCGACTTATTTCGGATGCTTGGCCGAAACCATCTCCACTTACCCGCGCCTGGCTGAACTGCACGACC
GACTCGACGAACTTGCCTTGGCCTGCAGGTCGATTGAGTGATCGTAGAAGCCGACGACACCCTGCACGGCACCGGCCAGCA
TTTCGTTCTCGGCATCGACACCCGCGGCTCGTTACGAATTCGACGTCGAGCCCCATCCTTGAAATATCCAAGGGACTCG
GCAAGCTTTGCGGGCAGATAGATTTGCTTCTCGAACCTCCCACCATGATCGAAACCTTGGTGTGCGCCTGGGCCGATGCCGG
CATAGCGAAACTTGTCCCCACCAGGATGGCGGCGAAAGCGGGCGAAAAAAGAGATTGCGAGC

>23A-E8

CAGCACCTGGCGGGCAAATGCAGCCTCGCTATAGCCATGTCGTGATGCAGATGAACGATGCCCTTGGGTGTCGCGGTCGAT
CCCGAGGAATACATCCAGAACGCCATCTCGTTGCGGTGGGTGTCGGCTTCGGCGAGATCGGTGGCGAGACCCGGCAACCATG
CATCGCGGCGATGGCGTTGGGCACCGCATGATCGGCTGCGGTGCCGTTGACGACGACGAGCGTGGGAGCGACGTATCCTT
GCAGGCCACCGCGTCGAAGCGGGTGCAAACTCGGCATCGGCGACGGCCACGGCTGCGCCGGAATCCGACAGGTAGAATTG
CAGCAGGTGGGAGGCGTCAGCGTGTGATCAACAGCGGCACGAAGCCGGCGCGCACCGCGCCGAAAAACGCGGCCGGATA
GGCCGGCGTGTGTCGAGGAACATCAGGATGCGATCACCGCGCTGCATTCCAGCGACCTGAAACCATGTCCCCACCGCGAC
GCCTCGGCGCAGAGTTCGGCGTAGCTGCGGCTTCGGCCGGCCCCACCAGTGCTGGCCGCTCGCCACGCCCGGGTACAGATT
GTCGAACAGGATGCGGCTCGCATTGTACCGCCCGAAATCGCAAATCCGATCTCGCGCGCGCCGGGACTATCGCTCGGGACA

GGATCCGTGATCTCGGCGGTTCATGACCGGCTCCGCCGGAGTTCGACGCCTCGTAACGCGCCATGAAG

>23A-G12

CGGCCGGAGATCCATGATGAAGCTATCACGCAGCGGAATGAGGTACCCGCGCGGTGCGTTACCGGGATCGGGAGCTGCCTGA
TTGATCGCAGTGCACATCCGGTGCACGGCGGCTCCGCTTGCACAATACTGATCCCCGGACGCAGTCTTGCCGACCCATAACAG
GTAATGGTTGCGCTGGCCAGTGGCTGCAAAGTTGAGCGCAATCGGCAACCAGATCGCGGCCGATAACGGATGACGAAACGCT
TTCGGATCACGCCAACGATGGTGTAGGGAGCGTCGTCCAGTTTGTATGCTGCTCCCAAGGACATCCACGCGTCCGCCGAGCTC
CCGCTGCCAGAAATCGTACTGACAATGGCGACGCGCGGTCCGCCCGGCTGATCCTCGGCGGCGGTGAAATTCTTCCCAAC
GCCGGCTGAAGACCGAGCACCGTCAGGAAGTTGGAGCTAATCCGGGCCGCTGAGAAATTGTGTCCGGTGCACCCGCATTCCG
CGCCCTTGAGACGCTTGTCCCGTCGCCACGCCAATGCCTTCGAAAATATCGCGTCCATATTGCGCCATTGCTGAACAGTTT
TCTCCGAGAGATTGAGTAAATCGCTGTGCGCGCGTTCCTCTCGAACGTTTCGTAATCCGCACCAATCGATCCGCTTTCGGA
AAAGGCAACGGCCGAGTAATGCGCTCTCGATTACCGAAAATATTGCGGTATTTCGCG

>23A-H1

GATTGCCGTGCGGGCGCTTGTGCGGCCATGACCGCGACCGCGCCAGCGCGGAGAAGAAATATGATCCGGGGCCAGCGAT
ACCGAGATCAAGATCGGCAATATCATGCCCTATAGTGGCCCGGCATCCTCCTATGGCGTGATCGGCAAAACGGAAGCGGCGT
ATTTGACAAGGTCAACGCCGAAGGCGGCATCAACGGCCGAAAATCAAATTCATTTCTATGACGATGCCTACAGCCCGCC
CAAGGCGATCGAGCAGGCGCGCAAGCTGGTGGAGAGCGACGAGGTGCTGCTGATCTTCCAGCCGCTCGGAACGCCTTCCAAC
ACGGCGACCCAGAAATACATGAACGCCAAGAAGGTGCCGACGCTTTTCGTGCGCACCGGCGGACCAAATGGGGCGATCCGA
AAAATTTTCCGTGGACCATGGGCTGGCAGCCCAATTACCAGAGCGAGGGGCGCATCTACGCCAAATACATTCTGGAGACTA
TCCCAACAGCAAGATTGCGGTGTTTTGGCAGAACGACGACGCCGGGCGGGATCAGGTCAAGGGCGTGCGGGACGGGCTCGG
CGCCAAGGCCAATATGATCATTGCCGACAAATCCTATGAGGTACGTGATCCCACCGTCGATTCCCAGATCGTCGCGTTGCACG
ATTCGGGCGCCGATATCTTCATGACCTGGGCGGCACCCAAGGGCGGCGCAGGCGATCCGCAAGGTC

>24A-D8

GGCGCTGGACCGGTCCAGCACGTCGGCCACCTTGACCTACGGCCGGTCTGAGCGGGATCCGGGCTACGGAAGGCTCCACC
AAGAATTCGCTCACCCCTCGGCCTGTGCCGCGACTCCTCCGACTGCGCCAGGGCCGCCGGTCTCGGCCTGCGCCTTCGT
GGTCTCGGCCAAGGCTTGGTTGCTGACTCGTTGGCCTTTCTCAGCGCGCTGTTGGCCCGCGCTGGACGCCGGCCACGGCCC
CCAACCCGACCACACCGGCCACCAACGCCACCCGCTCACCGCCAGTAGCGCCGCGACCGGGTTGCCGCTTACCCACTT
GCGCAGACGTTCCGCACTTCCACGGGTCGCGCCCCAATCGACCGGCTTCTTGAAACGCCGCATGTCTCCGCCAGCTCCA
CGGCGCTGGCATAGCGCTGAGTCGGCTCCTTCTCCAAGCATTTACGGCAGATCGTCTCCAGGTGCGCGGGCAGCTTGGGCCGC
AGCCGCGACGGCGCCAATGGCTCGTCGGTGAGCACCTGGCGCGACGTCTCAAGTGGCGACTCGGCCTTGAACGGTGGCCGGC
CGGTGAGCAGCTCATAGAGGATCGTCCCAGGGCGTACACGTCGGTCGCCGCGCTGATCGCGTGGTGCCGGCTGGCCGCGCTG
CTCCGCGCCATGTAGCTGGGCGTGCCAGCAGCTCGCCGGTATGGGTGCTCAAGTCCCCGCC

>24A-F4

TGCGTTATTGGCCTTGATCTCATCGATGCGGGCCATATTCTCAGGCGACGAGATGGCTATCAGATGCTGCATCCGATGTTTCGTT
GGTTTCGCCTATGTCGTAGATCTTGACGCGGTGCGGTGCACGCGGCCGCTATTGCTTCGATGACCCGCTCCATTTGGGCATACG
TCGTGTGAAAGTCGCCGACGTCATAACCGCAGGATACTCTGCGGCCGCGGAACGTTTGGCCGGTATTACCGCGAGTGTAGAA
GTCGAATTTCTCTCAACCTGGCCAAACGCCGATTGCATAGCAACAGCCAAACGAGTGCTCCATAGATCAGCTTCGTTGATT
TCATTCTGGATAATATAGCCTGATAATATCGGGAAAGATTGTTACGCAAATTATAGCAAATGGTTCAAACCTATTGCAGAAGG
CTCGCACCTCAGTAAGGGCGTAACCCGCAACATGATCCAACAAAGCAAACGGTGTGCCCAAATGCGCCTCGATGAAAATG
AGATCGTGGCACGAACCTACCGCCGACGAACAGTTCTAGCCAAACGCTGCCTCTCTCCGCCGAATATACCCCAAAGAAA

GAAAAAAGCACCGGTTTTGCACCCGATGCTGGTTTTGAGGCAACTGAAAAGTCACTTCATAACGTTAATGGTTCACTTCAAAC
TTTTACCCAATCTGGCCAATCACCGTTTTACGTTCAATCTCTCTTCAAAAACTCCGTCGCCG

>24A-G3

GGCGGTTTGAATATGAGCGACGACGAGCTGCTCAAGATCGACAACATCATCATCACCGCGTGCGGAACGAGCTGGCACTCTG
CGCTGATCGGCGAGCATATGCTGGAAGAGCTGACACGCGTTCCAGTCGAGGTCGAGTACGCGTCTGAATCCGCTACCGCAA
TCCGATTGTCAACGAACGGTCGCTGTGCATTGTGATTTTCGAGTCAGGCGAAACGGCGGACACGCTCGCGGCAATGCGCGAG
GCGAAGAGTCGCGGCGCTCGGACCTACGGTGTGGTCAACGTCGTTGGATCAACGATTGCGCGGAGACCGACGGCGGTATCT
ACGTTACGCGCGGCCCTGAGATTGGAGTTGCATCCACCAAGGCGTTTACGAGCCAGGTAGTCGCGCTTGCCTATTTACTG
AAGCTCGCTCGTTTGAAGGAAGTCTCCGTCGTCAAAGGACGACAGATGATCGAAGCGCTGCAGGCACTGCCTGCTCAGGTGA
AACAAATCTCGACCGCGCCGAAGAAATCGAAGCTCTCGCGGAAGAATTAAGCGCGCGCAGAAGTTCTGTACCTCGGTG
CGGATACAATTTCCCGACGGCGCTCGAAGGTGCGTTGAAGCTCAAGGAGATCAGCTACATCCACGCAGAGGGATATCCCGCG
GCGGAGATGAAGCATGGTCCGATTGCGTTGATCGACGAGATGATGCCCCGGTTTTTCATTGCTCCG

>25A-A1

GCTGCCGTTTGTAAAGACCGGTCCCTTACAATGTACGATTCAATATGCTCCGCGGATTCCGCAGTCCGCAGCCTTGCTACG
GTACTGTGCGCCTTCTCAAAGATGGATACAGAATCGGTGGACATAGCCTCGCCTCGCATCGGTTCCGAAGGTGTCGTCATTT
CTAGTGAGCAGGGCTCCCGTCTTCTGTCCGAGCGGGCGGCCGGTTCGCCGGATCGAAATCAAGCAGGATCAAAGGCCGGTG
CAGACCGCATGAAGCATCGCGCACACCAGCGACACGAGCGAGATGACGGCATGGAAAGCGCTCCGAAGATGACGTCGCTG
GTTCTCACCCGACGATCGGCGCTCGTCGCGCAATGCGCGCTCAACAGGACCCCGAGCGCAACATAAACAAGTCCGGCCA
CAACCAGGTAAAGCACGTCTTCTCCATATCAGCAGCCCGAGGCTAAGCGTAGAGCGCTCGATGATGCTTTCCGGACGGC
AAGCTCTGTGATCTCCGTTTACGAAAGACCTTGTGAGGATGACCGTGCAGGCGCCGGCCAGGACGGATCCCTTGACTT
GGGCGCTGGCGCTCCACGACAGGGTCACGACCGCTTCAAGAGCGGTTGCAGATCGCGCGCAATCCGGCGTACTCGTACAG
CAGCGCAAGGGCGAGACCGATCGCGACCCGAGCAGCTCGGACATGTGCTTCATCCGGGTCGCGTG

>25A-B8

GCCGCCGAAAGGCTCGGCGTCTTGGTCAAGCGCATTTCAAGTGCAGCGACCGCTGAGCCGCTGGGGGTCATGCTCGACTACGG
GTGTGCTGTCGACTCCTGGCGCTGATCCTCGCGCCGCCGTTCTGTGCTCAACTATCTTACGGTTCACGAGGTGGCGCATCTGA
TCGAAATGAATCACTCGCCGCGATTTTGGCGGCTGGTAAACAGCATCTGCTCCGATGCCGGCCGCGCAAGGCCTGGCTCGAC
ATCCACGGCACCGACCTGCATCGCTTCGGCATGTCCGGCAACGCCTAGTACCTGCTTTCCGGTGAAGTGTGATTGCTCGTGGC
CCATGCTTCGAGACGCGCATAGCGCGTCAAAGACGCGCGTAAACGCGCTTATGGTGCCTCCTCAGCATGAGGTTGTGCCTT
GTTGCAACAAGAAGAACCTCATCTGAGGAGGCCCGCGCAGCGGGCCGCTCAGGATGGGCCACGGCAAGTATCTGTGAT
ACCGGTTACTAGCAGATGCTCCGCCCGGTTGCTTCGATTGACGTTACTGCTCGCCATGCTGACCGGGCTCGGGCCGCTAT
CGGTCGACATGTATCTGGCGTGCCTGCCGTCGATCGGCCGTTTGTGCTCGCGCGCCGACGTCGCAGGTGCAACTGACGATCTCG
GCCTACCTGATCGGGTTCGCCATCGCACAGATATTCCACGGGCCGCTGTCCGATC

>25A-E7

GTCGAATTTCTTTTCGTCGCTGTCCGCGCCGCAATACGCCCCGTGCGCATGAGCTGGCTGATCACGGGGTAGAGGGCGCTGC
CCTGATGCTGCGGCGAGCAGGAGTACCGCAGCCTGGTATGGGGCTCATTCTTTAGCTTTACTCCAATTCGCTGCCAGCCGC
GATTTGCCGATGCCACCTCGCCGACAGCAGCAAACTTGACCTTCGCCGACTTTGCCTGATTCCATCGGCGCCAGAGCAA
TGCGAACTCTTCTGGCGGTCGATCAGCGGCAGATCCGGGGAGTGCAGCGCCTCGAACCGGCTGTCGACCGCGCTCCGCCCG
AGTACCCGCCAAGCGGTAACGGCTTGGCAAACCCTTGAGCTCTGCATGCCAAGATCGTCACACTCGAACAGACGCCCGG
TGAGACGACGGGTGCGCTCGTCGATACAACCGTATTCCGTTCCGCAATCGCCTGCAGCCGGGCCGCTAAATTGGGTGTCTCT

CCGACGACGGCCGGCTGGTCCATCTGGGCTGAATGAATGAGGTCTCCGACGATCACAATGCCCGTGGCAATGCCGACGCGAA
TTCGGAGTTTCTCGGACGCGCTGACCCAACCTACTCACGGTCTTGATCAACTCAAGACCTGTGCAATGGCGCGCTCAGTATCA
TCCTCCTGGGCCACCGGATAACCGAAATACGCCAGAATGCCATCGCCCAGATATCGGGCGACCA

>25A-H10

CACCCGTTGAGCGCATCCCCATGAACTCAACAGCCTTGACCGGTGCGGGCGCAACCGCGCCGGCTCGAACTTGAGAACTGCGC
GCGAAGACGACGGAGCCTTCCGGGATGCGGGCGTGTCTTTTTCAGGCCTCGATATCGGCAACTTGAAGCGCGTAGTTCGGG
TTCGCCTTACCTGATCGACGATCGAGATGACCACGAGCGGCCTGATGGCGTAGGTGCGGGGAGCTCGTCGATCGCCGGAT
ATTCCGGTGCCCAATGGGCTGGCGGATCGAGCTGCGTGCCGAGCTGATCGGTCTTAACCATATTCTGTGCCTCGAAGCCGT
GCTTCTCGTGCTCGGTGTGGAACCGGCCCTTGCCGGCGCGAAGGTGGAGTCGGCAAAGCCTGCCAGACCGGGATGGTTGG
CGTGATCGTGTGCGTGAGGTGACATACTTTGCGCCCTTCAACGCCTGCTCATAAACCAGCCAAAGGCTCTTGCCTCTGCCG
CATCGCTCACGAACGGCATCATGACCGCGCACGCAGCGACCAAGGCGGCAAGCCGCGGGATGAGCCAAATCCGCGCTTACC
TGATGTCATGCTCGCACCTCTTTGCGCAATCTCGCTCAGTTCACCAGAATCGGCCGCTTGACCGACGCGCCACTGTCAAC
AGGCCGAACGCGAGATTGATCGCCACGATGCGGGCGATCTGCCAAGCTGCTTGGCGGCTTC

>26A-B6

TCCTTCATTTCCGCGGTTATCGACACGGTCGTGGGCGCCAAGGAGACGCTCGAAGCGTTGAGCGAGGCGAAATTGGGCAAGG
CGTGGGACGCGGAATCGTACCATCGGATCAATGATCATGGCGGTAGGCATCCTCGCTGAATCCAGTTTGGCAGGACCTAT
AGGCCTGGTGATCGTGGGAGCAGGGTTCATCATCAAGGCGATCTTCCGGGACCCCAATGACTACGAGAATTTTATCAACTTCA
GTTTATTGCGCAAGCGCGAGGGCGACCGGGAGGAAAAGCCACGCTGGTACAAAGCCGAAAAGACTTTCGAGGAGTGGGAAG
ACGATCTTGACGAGCAGATCCGGGCGGCGCTGATGCTCCTTTGCAAAATCAGAATTGAGCCGGCGGCGCTGCCGGCGCTGC
CGACAATATGAGATACGAGTACCCATCGGAAGCGTGGATCCACTGGACCACCGACGCGTGCAGAGGGGAACAGTCAAGAT
GAGTTGATTCCAAGGGGCGCAAGCTGCACCTCAAATACTCCGAGGAATGGGTGGACCGCGGGATGGGCGAGAGTTTACC
GCCGATCTCGAGTTCGAGAGTGAAGATAAACCACGATGCCTGCAACGAAGCTTGACGTGCAGATACAGCCGGGAGGATCG
TGGTAATTCAGGCTCCCGGTGCCACCGCAGCGGGAAAGCCTCTTTTGTCAATCACTGATACTGGC

>26A-D5

TCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA
CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCA
CTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGAACCCCTTGCGGCCCGCCGGG
CGTCGACCAATTCTCATGTTTACAGCTTATCATCGAATTTCTGCCATTCATCCGCTTATTATCACTTATCAGGCGTAGCAAC
CAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTA
AGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCCTTGGC
TATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAACTGGTGAACTCAC
CCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAA

>26A-F10

CAACGCATAATGTTGCCGTTTCTCGTCTAGGAGTTGCAGTAGCGGGTATCGCCGCTTGACCGACTGGCGAACCAGAAACAT
CCCGAACTGGTTGACGTTTCGGTATCCTGGGCTGGCCCAATCGGTCACATCGTTATCTCGTTCGCACATCACGCCCCGGCCTC
AGAGGCTTTTGCAAACGGCGGATTTTCGATTCTCGGCGGTTGGTTTGGGCTCCATGCCGCTGCTTCTGTATCGACGCGGTGC
AATCGGCGGCGGTGACGTAAAGCTCTTTGCCGCTATCGGCGCTTTGCTTCGAACCATGGTCGGTATCGAAGCGGAGTTTATT
GTTTCATGGCGGCCGCGCTCATCGCGCCGCGCATCTCGGTACGAAGGAAAGTTGTTTCGCACGCTGAAGAACTCTCTGCTC
CTCGTCTGAATCCGTTTACCCGACAGACAAAAGCGGGTCTGTCGAGCAGGAAAGCATGTCGTGGTTTGCCTCGGACCAGC

CATTTTCGTCGGGATGATTTTGACAGCCGCGCTCTACTGGAGGGCTTGAATCATGAGCAGTTTGAGGAGCTACTTCAAAAAAG
TCGGTAGACTGATCGGCGACCGGAGCGGCGCAGCCCTCCCGGAGTTCGCGATCGCGATCTTTCCGCTTTTGTGGCTCTTCTTC
GTGCTCGTGCAGGTCGCGACGATGTTTCAGCGCGCACCTCGTCCTTACCATGCGGCG

>27A-A3

CGAATGCCGAGCGACTGGAGGATCTGTTGCGCGACGAGCACTTCCTCTGTGCGATCGCCGTTTCGGTTTCGGCGTCAAGGAAAC
GCGAATCGTGTGCGCTATGCCATCGGCGAGCAGAATTGACAGAGCCGCTGAGCTGGCGACGATGCCCTTCATCCCCATTCCGG
CCTCGGTGAGACCGAGGTGTAGGGGGTAGTCGCATCGCGCGCCAAGCCGCCGGTACACCTCCACGAGGTCGTGACGCCCGA
GACTTTCGCCGAGATGATGATCTGGTCTGGCGGAGCCCTACTTCTCCGCCAGCTCCGCCGACTTGAGCGCGCTGGCGAGCA
TGGCTTCGACATACACCTCCTTCGCCTCTCGTGGCGCCGGCGAGCGTGCCTTTTCGTCCATCATCGTCGTCAGCAGATCCTGAT
CGAGCGAGCCCCAGTTAACGCCGATTGAAACGGGCTTGTCTGTTCACGGCGATCTGGACGATGGTGCAGAAATTCCTGCTCC
CGACGCTTGCCGCCACGTTGCCCGGGTTGATCCGGTACTTTCGCGAGAGCCCGGGCGCACGCCGGGTACTTGGCCAGCAAGA
GATGCCCGTTGTAGTGGAAGTCGCCAACGATCGGCACGT

>27A-F2

GCGTTGCCGGGTGAATTCGGGTGCGAAAAAGAATTCGTCTGCATAGATGTTTCCGATGCCAGCAATCAACTTCTGGTTGAGC
AAAATCGTTTTACCGCCGCACGATGCTTTTTAAAGATCCCTTTGAACTGCGACAGATTGATCTCGAGCGCTCCGAACCAAG
TGC GCGGTTTCTTAAAAATTCATCGACGTCTCTTAAACAATCCGATCTCGCCGAATTTGCGCTGATCCCGGTATGCGAGCCGAG
AATGATTCGCGAAATAAAAAAGCACTCGCGTATCCTTCGTGCTCGTCGCTGGCCCTTGAGATACTCAAGCGAGCCGGTCATG
CCGAAATGCAGCCGAACAGAGGTCGCGATCGGTGCGAACAATAAATGTTTGCCATGGCGGCAGCTCGATTGAAAGGAGC
GGCCTTTTACTTGACGCCAAGCTCCCGCTCAGAAATGCCCTTCAAACATATGCGCTTCGCACCTCGACGCTCTTGATCGGCT
GATGCAATGAGGTCGCGTCAAGATATCGCTTGAACGTTTCGACGTGCGGTAGCTCTGGCATCGCGGCTTTATTTTAAATTGCTC
GATGTATTCCTTCAGCGCGACGGCATTGTTGTGTTTGGTGTCTTTGCCCCGAACAGAAAGTGTACGCTCCGCCTTCTGGCATC
TCGTGCCAGTTTTTCAACTTGGTACGGCGATCGTCGAGCTCTGCCCAATATTTCTTT

>27A-G5

TCGCTGCGTCGCGAGACGATTTACTTCACCTCGACCGTCACTCCCAGCTTGCTCGGGATTCTCCGACAAAGAGCATGACGGG
TGGGATCCCAGAGGGATGTTGCCGGGAACGACGGCGTTACCTGCATCATTCCCGCGACCTCTCTGGAGCGCCGCCGGCGT
ATTGGATTTGCGGTTCTGGCCGCCGATGTTGACAGATACGGGTTGAGCGGAGCGGTGTAGGGAGCCGTTGCAAGCCGGCC
GTCGGCGACCTGCGGATTGGTGGCGCCTGTCCCGTTACGAACAAGGTCACGATGGAACCTCGAGGGGCCGATTGGACGTC
GAGTTGAAGCTGCCGCTCTGGTTACAGACCGCGCCAGCTCCTTACCAGTGAATCCCGGTGAAGATGCCAGGGATGGCTG
TGGATACCGGCACGGAGACAGGAGTGGACTGGATGCCGTTGTATTCAACGACGAGATTCGCGGCTGTGCCAGTGACGCCATA
CGGCACGATCGCCGATACCTGGCTGTCCGACGTGTAGAGGATGGGCGCGGCGATCCCGTTGAACAGGACGCGGCTTCTGAT
GCGAGCTTCTCGATGAAGCCGCCGAGTTGAGTTTCGTAGCTCGCGAGCTTCTCGGGGCCAGCTGTGACCGGGCGATGTAGG
CGATCATGCCGGGCGCGATTCCCGGCGCGTAGCTGGCGGGCTTCATCACTCCCGGGCGGGCGAA

>27A-H4

ATGACGAACTAATTACGTTCTCGTTTCGCTCGATGCAACAGCACGAAGACCTCGCTGTACCGGGTTCCGATCGCGGAGGCAC
CGCCGGCTACGAACACGACGGCACGTTTCGTCTGTGATCGAGGGCATGCTCGCCGGCGATGGACCTCATGACGCACGGTCCG
AGTTGGTGCCTTCGCCACGTTTCATCGGTATCGAAGTGGTTTAGCAGAGACAAAGTTTCTCAGACGCCACGCCGGCCCTCTCT
TTCCACGCTCTAGATAGGTAGGTGCAAATGACATAGGCATGGCGACGGCGCCATGCGCATTGCGTTTCGGTACTACCGGGTGC
CGGGAGAGGATTGTTTTGCTGTGAGCTGGAAGGCTTGGCTATTCATTGGGAGCATAAGCTTGGTGTCTCTACGCTCACCGCG
CGCGACCCTGCCGTTTCTCATGCCGACGCTCCGTTTCGCGAGGCAGGACGGATCGATAGGTGCGACCGTGGCGACCATTCCGGC

GGTTATGACGCACGCTCCTCTCACGCATTGTAAGCGGTCGCGATGGCGGCTCGCGAGCCCTGAGGCGCTCAGCAACTCGCTGC
TTTCTATTTCCACATCTGATTCTGTCACCGCGAGAGCCTACCCGACAACGTGCCGCTCTCGATTCTGGATTGGAAGACGGAC
TTCCCACTTGCGGAGCGCTCGCGAGAGCAAGCAGTCGCGCTCGCATCGCGGCTTTTCA

>28A-A9

TCCAGCATGCGGCCGTCAGTGCGCGGCTTGCGCCATCACCCGTTTCGCCCCGAGATACATTTCCAGGCTGCGCACCGTGAACA
TCGCGGCGGTGAAGACGATCAGGGCATCGACGATCACCGCCGGGTTGACCGGCCAGTCCGCCCCGCCAGTCCCGCTTCGGT
GCGCACACCGTGCGCAGCGCCAGCAGCGCCACCAGCACGATCAGCCCCGATCGGACTGGTGGTGACCATCAAGGTGCCGTTT
TCGGGATGGACCTCGATCGCCAGGGTGCGCCAGCTGCCAGCCGCAATGGCGCCCAGACCAGCGCCAGCGCCAGGATCG
CCCAGTCCAGCGGCAGCAGATGGATCGGCGCCGCGCCGGGCTTTGCCGGCAGCAGCAGCACCGCGGCGCAGGCCAGCAGCA
GCAGGGCGGGGCAATCCAGAGCAGTCCAGCTTACAGCGGCTGCGGCTTGCCACCCGTCGCGCCCGCAGCAGGAAGACAA
ATGCGATGATCGCCACCGAATGACCAGTTGCAGCGTTTGCGGCGACATGGAGAGCCCTCTTTTTTCGGCAGATTACACGATC
GGCCCGTTCCCGAAAGCGGATTGCTACTGCAACACGGGCTGCCAGCCGTCCTGCGACCAGCGGAAAATCTGCGGTGAAACGG
GCCACTCTCCGGCCTGAAAAGCCCGCTGTGTCAGGGACGAAAGCGCGCAACGGCTTCAGGCCCGTC

>28A-E10

TTCGTGGAGACATCCGCCATGATGGCGATCTGCTTACGGAAGCGGACTGGCGGGAACCTTGCCGAAAGGGTTCGTGACAGTG
GCGAGGCTTTCACTTCTCCGTGGCTCTGCTGGAGGCCACCTTCGGCATTTCGAAAGAGCGTGGTCTTCCGATTTCCGTGCGCT
ATTCGATCGTGCAGACTTCGTGATGCCTTTGGCTTGACGGTGGTGAATCTCGCCAGCAATGATCGACGCAGCGGTAGAT
GGAGCGGAGAAATACGGATCGGGTCTTACCACCTCAATCTCGGCGATTGCATTAGTTATGCTGCGGCGAAATTCGATAATG
CAGCGATGCTCTATACAGGCAAGGACTTCGCCCGTACTGATCTCGCCTAAGGCATTTCCCGAAAAAGTTGATTTACTTTTCGA
TTAAGAAAGTTCGTGCAAAACAAAGAGTTAGAAGAATTGCGATTTCAGAGAAATCGCACTTTCTTTAGTGTTCGGCTACTCCC
CCTCCCGGTGCTCCCTGACCCCCAGCGCATCCGCCAGCCTCGCCTTTGCCGATCCGGGCTGCAACGGCTTTTGCTGGCTCTCAT
GCGGCACCCAGCCGAGATCCAGACCAGCTCGAAGGTGGCGCGGATGCGGCCATCGGGTCCGAGAAGCGCGACTGGTAGA
TCTCGGCCATGCGCAGCAGGGTAGTCCGGCGCGTGAATGTCTTGCGGCGTTGGGACATGG

>28A-G4

TCCCCAGGCGACCGCGGCCAGGGAAGCGCTGACCCACGCTACGCCATGCTGGGCAAGGGCGCGCATGCGGCGGCTCCCA
AGCCGCCCGCGGCCACGCTGAAGCATTGGCCAGAAGGCTGCGGAGGACGAGGCCACGCGGCGCTGGCCGCCGAAG
CCGCCAAGCCGCGGCCCGCTCGAGCAGCTCAAGCGCCAGGCCGAGGACGAGCAGCGCCGCTCGAGGACATGCGCCGCC
TGCAGGAGGAGGCCCGGTTAAGATCGAGGCCGAAGAGCGCGCCCGCGGACGCCGAAGAGGCCCTGCGCTGGCCGCCG
AGGCCGCCGCCACAAGAAAGAAGAGGAAGAGCGGCACCGCATGAGCGAAGCCGAGATGCGCAAGAACCTCGAAGCCGAG
ATCCGCAAGCAGCTGGAGGACGAGATGCGGCGCAAGGCCGAGGAGGATCCGCGCGCATGGAGGCCGAGCTCCGCGCC
AAGATGGAGGACGAGAAGCGCAAGGCCGACGAGGAGGGCCGAAGCGCGCGGAGGACGAGACCCGCCCGCCTCGAGGA
GGAGAGCAAGAAGCTCGAGGCCGAGAAGGCCGACGTCCGCCCGCATGGAAGACGAGATGCGCAAGGCCATCGAGGCCA
GGAGCGCGCAAGAGCGAGCGGAGAGCCTCGAAAAGATGGACGCCATGCGCAAGCATGAAGAGCAGGAAAACAAGA

>28A-H11

TACGGGCGGACAGGCCCCGACGAAACCAGACCGCAACCGCCGGCGTCCCGCAAAGGATCGCTGGCGCCAGGGCGGCCCCG
CAACAGGTGCAAAACGCATGAGAGATTTCAAGGGTATGAAGCGTCAACCGGACGCAACCGCAACAGCGGCGGCGGCCG
GCGGCGGCAAAACCGCAGCACAACCAATCGGGCCTTCGATTCCAACGGCCCCGAGGGCGTCAAGGTGCGGCGCGGCC
AGCATGTCTATGAAAAATACCAGCAACTGGCCCGGACGCCCACACCGCCGGCGATCGGGTCTGGCCGAAAACACCAGCA
GCACGCCGAGCACTACTTCCGCGTCATGCGGGTTCATGCAGCCTCAGCGGCCCTGACCGAGATCATCGGCCGCGATCAGTTCCG

TGTCGGCTACGACATGGATTTTCGAGGATGAGAACGGGGTCGGCGAGACCGTCAAGCCGAGGCGGAAGCCGGCGAGGTCA
ATGAGGGGCCCCGGCGAGCGCCAGGAACGCTCCGAGGGTACC GCGATGAGCGGCTTCGCGACGACCATCGGCAGGGCGAGG
CGCGGCCACGCGACGACCGGGCCGAGCCAATGCATCCCGAACCGACGCATCCCGGGGGACGCTTCACGGGGCGAGCGGT
GGACCAACGATCGCGCCAGGACCGATCGCGGCGCAACGAGCGGGGCCCGGGATCGATTCCAGACCGATC

>53A-A3

GTGTGAAATGCGTCAAACGATGCTTCTTGGAGGCAAAGCGTGGCCTTCGCACCGAAGCTGTACTCTTGTAGAATGGGCTGG
CGACGCTGCGAGATAAGTTGAGCGGTCCGCGAATGATCGATTTGAAAGCAACTTCCAAGCCATCCGAGTCGCATTTGGAACA
CTTGCGATGGTTACATTGAAGGTGAACGAGCGACCGTTCGAGCCAACCCATTTAAACGCTGGTTCAAGGATCGCCGCGAGCC
AACTCTCGTGCTTCGCTGGCTTCATTGGAAGGTGCACTGAAGGTGAGGCGGTGCCGCCGACGATCGCGAACAAATCCAAA
ATTGTATGGGCCGAATCCAGCCAAACTGGCCGACCGGGAAACGGCCGCGATCGATTGTGTTTACAGGTACCGGACGGCCTGC
TGCCCGCAGCGCCCGGCTGAAGGATGAGCCGACTAGCCCTTAATTCGGAGATTACGTCAATGAGGCGTGGCGGTTTGCTTG
AGATTCCGCCCCGCCAAGAGATCCGATGGCCCTCATCTAAGGGTGAAGCCAGCGTCCGCGCCGTTATGCCGATGCCTAG
ACCGAATCGTTTTGAGGCTAGCGCCGATTGGCTTTTTCCGCGACTTGGAGCGGCGAGTGGCCATCCGACACACTTCGTCGAGG
TTTGAACGCCTCGGCTCGTCATGCCTACGGCTTTTGACGCTCGCTTAAGGGCAGTGACCTCCTTT

>53A-B2

GGCAAGATTTCTTCAACGCCACTCAATCTATCCACTTCTTCGCGAATGACTCGGATCGACTGCTGGCTTTTCGCGGGGTGA
GCCGAGGGTGAATTCCTTCCAGGGCGCCGCGGATTTGATGATTGCGAGCCCAAATGAACTTAAGTCGTGCACGCCTCTCCTT
ACGGTTTCGGTAAGCATCTCCGACAAACTTGGTAGCCAGCCAGGTAAAAACAAAGCCGAACATAGCTTCGATCGGAATGCGA
TCCTTCGCACCGTCAAACCTCCAGAAATAAAATCCGGTAGGCCGTTTCCCCATCCCAAACGAGGCAACAACACGATCACTCC
GAACAAATAAACTTTCAGGCGCTCGATCATTGAAAGCGTATGGAATCGTAGCTTTCGTCGGGTGTTTGCAGAACTTTATGG
CCAAGCTGCCCCCAATGATTGGTCACGGCTCGCGGACACCAGCCAGCGGTACGTGCCGATTTACTGAAATGATAATTGAA
ATTACAGCCAACGGCGGGCGCTCCGTCAACCCATCCAGACAGCGAATAGCTTCCGGAAGTGGCCGACGTCGCTTACCAGC
GGCGGGGCTGGACAAGGAAGTCGTCATTGGCCCCATAATGCAAATCTTTTACAAGTCGCTGACGCTCCCATGACACGGGAAT
TGGGCCCCGCAATCTAAGCTGCCTCTTTGATTGCAAGTCCCCTGCCTCGAATCGCGCA

>53A-B3

CGCATTGGTGAAGCTGCTCGCGCCGAGGGCGATCCAAAAATAGTCCGATCGTGCTCGTGCAGGAGTGTGGTGTGATGCGCG
CCAACGCGCACGCGTAGCACACGAAGAGTCGAATCCTCGAACACGAGGTGGTGTGATGCGGCTCGTTCTTGGCGAGAACCCTC
CAGGAATGGATTGCGCGCAACGGCGCTTGTAGCGAGCAGCAACAGAATGGTGCAGTGAACATCGAGGTCAGAGGTGAGG
GCACAAAGGCGTCACGGTCGCAGTGGACGGGACAAGATACTGTGTCGTCGCCAACGCGAGTTTCGGATTGAGCGAGGCGT
CGACAAAGCCGATCGATGCGAACACGGCAGAATCGATCCGGCCGCAATGGCTGATACGCCGTGATGTCGATGTCGGAGTA
GTTGAGCTGAAACAGTGCATCGCCTTCGCCGAATCGAGAATTTTCTCATGGCGACGCAGGTAGCGAGCCTGCATCGCCGGC
GACGATTGCAGCGAGCAACCGCGGCCGACGTCCACCCGCCCTCGACGACCATGATCGGCAAACTCCGTCGTTGGCGATCC
GCGCGTAGTAGTCGAGCGGGATCTGATCCGGTTCGGTATAGACGAAATACGGATAGGACGAAATCGCGAGGGTCTGGATGA
ACGGAATAATCGTGAAGTCGGTCTCCGCGCCCTGTACGCGGCGGGCGGTGGCCCCACGCGAAGTCCGC

>53A-D2

AATTCGTCGCTGGTCATGGAACATTTGGCTGTATTAGGCTTAGAGATTGATACAGAAATGAATAATCGCTCTAACTCCTGTG
GTGAGCGAATTGTTTCCAGTGAATAATGCGCGTGTCAATTTGTGCCGTTATTCGACTAACGAAGAAAAAATGATTGCTTTGGAT
GCCATTCATTTAGGCAAGTTAACGCGCCCGAGAATTTGCATAATTTAGTTGAAGTATTGTAGAGAGATTATTTTCATGAA
GGTAGATATTGATACCAGCGATAAGCTGTACGCCGACGCATGGCTTGGCTTTAAAGGTACGGACTGGAAAAACGAAATTAAT

GTCCGCGATTTTATTCAACATAACTATACACCGTATGAAGGCGATGAATCTTCTCGCCGAAGCGACGCCTGCCACCACGGA
ATTGTGGGAAAAAGTAATGGAAGGCATCCGTATCGAAAATGCAACCCACGCGCCGGTTGATTTGATACCAATATTGCCACC
ACAATTACCGCTCATGATGCGGGATATATTAACCAGCCGCTGGAAAAAATTGTTGGCCTGCAAACGGATGCGCCGTTGAAAC
GTGCGCTACACCCGTTGCGGTGGCATTAAATATGATTAAGTTTCATTCCACGCTATGGCCGAGAAAATGGACAGTGAATTTGAA
TATCTGTTTACCGATCTGCGTAAAACCCATAACCAGGGCGTATTTGATGTTTACTCACCGGATA

>53A-D3

TCCGGCCACGTTTCGCGCGGGTTCGCGGAATATGTCGATCGCATCGCCAAGGGAGCCAAACCCGGCGATCTGCCCATCGAGCGA
CCCGCAAGTTCGAGCTGATCGTCAATCTCCGGACCGCAAGGGCATCGGGCGTACCCTGCGCCGCTTCTGCTGCCCCGCGC
CGACGAAGTGATCGAGTAGCGTCCGGGAATTAGGCCGCGACCACCAGGTTTCGAGGCGAGCTGGCGCACAGACTTCACCATCG
CCATGGCGACGAGTTTGCCTGTCTTTCGCGTCTCCTCGCTGACCGCCACGTCTCCCTGAAGGTGAAGCGCCAAACGCGCCC
TTGGCCTCGAGCTCGACAATGTGCGTCTGATGGTGGGATCGGCCACGATCACGACGCGTGTCTTGTGAGGCCGAGACCTGC
GATCGCGCGCGCGCCGAGATGTTGACGTTCTGCGGATAAAGCCGTGCACCCTCGCGGACGGGACCGTCAAGACGGTGTGC
GGCGCCTCAGGGAATCGAGATCGACGAGCGTCTCCGCGACCGTGCCTTCCAGGCCGACGGATCCTTGCACACGGTGACGG
TGACGCTGTGAGGCCACCGACCGCCGCGTGTCTCAGGATATCGAGCGCGCCGATGCCGGCCGAAGGCAGGATCAGGCGCGT
GCCGCTTGTCTTGGCCGCGGCCAGCAGGCGTGAACAGGACCGTATCGGTGAAAGCGCCAACAGATG

>53A-F3

GCGCCCGAGTTTCGTTGTAACGCAAAAGGCCGAGGTTTATCGGTACAGTTAGAGCGTGATCGACTCGGAAACCCGGGTCAA
TCGTGTTTCCGCTTGCAGAGAGCGAATAAAAAGGCCGCCCCACCAGGAGCACTACGGAGAAAACGAGCTGAGCAGTGA
CAAATACTGCACGTAAGAGCGATCGATGAGCTCCGCGCTGCAAGAAGTTTTCGCTCTTGAGCGCTATGGCTATATCCGACCGC
GAGGCCTCTAGTGCCGGTGAAGTCCAAAAATGATTCCCGTGCACCCGATACAAATAGTGTGAAGCCAAGCACGCGATAGT
CCACTCCCAGATCGAGTGAGGCAAGCGGAGTGGTTTGCAGGTATGAAATCAAAGCTGATTAGCCCAGAGCGCCAGTAACAG
GCCAAGGGCGCCGCGGCAATCCAGGATCAGGCTTTCGTTAACCCTGGCGAATTAGTTCGCGCCGCTGATGCGCCGAGC
GCTTGCTGATGGCTGTCTACGACGTGCAATTGCTGCGCGAGCCATAAGAAGACTGGCGATATTTGCGCAGGCGATCAAAA
GCACCAGCAACACAATGCCATCACGATTCCAGCCAGCGGAACGCTTCGGCTTGATCCCGTGGATCCATTCCACCGCTCATT
CGAAGCAGTTGTACGCTGCGCAAAGTCTCGGCATTGTCTTTGTGCGCGTAAGTTTCGGCTACGTG

>53A-G3

GACTTGCCGGCATAACTTCCCGATTTTACGGCTGTGCGGAGCGCCTGGACGGCATTTCGCGCCCGGGGGCCGTGGCATGAG
CATCTGCAACAGCAATAGGAGACTGCCACATACGTCGCCCCATGAGAGCCGCGCCTGAGCGTGAGCCGGCTGGTCCCCGGA
TGAATGAAGACATCCGGTCCGCGAAGTTCGACTGATCGACGAGACCGGTCAAATGTCGGTGTGCTGGAGACTACCGACGC
CTTGCTCGAGCCGTGCAAGTCCGCTCGACCTGGTGCAGATATCACCGATGCTGCGCCGCGGTGGCCAAGATCCTCGACT
ACGGCAAATTCAAATACCAAGAGCAGAAGAAGGCCGCGCAAGCTCGCAAGCGGCAGAAGGTGCTGAGATCAAAGAGATCA
AGATGCGGCCAGCATCGACGATCACGACTATGACGTGAAGATGCGGGCCATCGCGCGCTTTTTCGACGAAGGCCACAAGGT
CAAGGTGACCTGCGCTTCCGCGGCCGCGAGATGGCGCATCAGGAGCTCGGCTGGCAGGTCTGACGCGGTCAAGGTGAC
ACCGAGCCGATCGCAAGGTGGAGTCCGAGCCGCGCATGGAAGGCCGCGAGATGGTGTGCTGGCGCCGCGCTAGACG
CGGGTTTGGCCGGCGACCGAGCCGGCCATTGCCTATCGCAAGCTTCGCCACTATAACCCGCGGCC

>53A-H1

CCGGTAATTGCCGACTGATCGGGGGTTCGGCTCATCGCATTCTCTCCGGCAGAGGACAACGACCCTGCCGGAGGATCTCATGA
CACTACTCTCGAAGGCCAGCCCCCGCGGTACGCGGAGTGGCGCTCCAGGACTCCCAGTGTGCTCGCCACGGATGG
AACGCCTGGCGGAACGGTGCCTTCGCATCGCCCGGCTGCTCGCCGAACGCGATGACGCGCCCGTGCAGGTGGTGGCGTGC

ATCGATCCC GCCGCTGGCCGTGACCGACCTGGCACCCGATGCGGTGCCCGGCCGCTCATCGAAGTGCTTCACGAGACAC
TCGTCCGCCGCTGCGCGACCAGCTCGCCTCTGCCGGCAGCAGCGACTGGCCGGTCGCGATCGGCCGCGAGCAGCCCGCGCT
CCGCATCGCGCGCGCTGCACACGAAGCCAATGCGTCGCTCATCATCCTCGGCCGTTGGACGGCATCGCCCGGTTGACCGCCTGC
TCGGCACCGAGACGGCGCTTACGGTCGCGCTCTGCCGACCTGCCGGTGCTCGCCGTGCCCGAGGATGCCACGGAGCTCCC
GCGGCATGCGGTGATCGCGACCGACTTACGACGACGAGCAGCAGGGCGCTCCGCAGCGCCGCGCGCCTCATCGACCCGGGC
GGCCGTGCACGCTGGTGCATGCGCTGCCACAAGCCACCGAGGGATCGGGCACCCCTCGCGCCG

Anhang 4: Sequenzen: *phnJ*-Fragmente aus dem Boden A17 und NM

>A17-Gly4|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGTCGAATTTCCG
GCGTCGGCGACGGATCCATCACATAACGCGCGTTCACCTTACC GGATACGCATACGAAGTCGCGATATGACCAAAGCGCGC
GATATCCTCGTACAGCTTGACGTGCATCAACCCATATTCGCCGAGCGCGTGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTCGCGTGGCTCCA
GGAAACGCAGTGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGTCCGGTATGCAGCGGTGCTTCGGGAATCCGGTGCCG
GGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGCGGTGCTCGTTGCGACGCCGGCCGCTTTGCCGAAGAATTTGCGGATCGAGATCG
CGTTGGTGGTGCATCCGAGCCCTGATCTATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCA
TGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAA
ACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGAT
CGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGT
TACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCG

>A17-Gly10|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTGATCGA
CCAGGGCTCCGACGACACCACCAATGCGGTGTCGATCCGAAAATTTTCGCCAAGACCGCCGGCGTCCACACCACCAGTGC
ACCGCCGAGGCGACGGTATCCAGACCCGCCATCGTATCCCCGAGACGCCGCTAACGAGAGCCAGGTCCTCGTCTACCAGG
TTCCGATACCCGAGCCGCTGCGGTTCTTCGAGCCGCGGAGACCGAAACCCGCCGATGCATGCGCTCGCCGATTACGGGGT
GATGCACGTCAAGCTTTATGAGGACATCGCGGCCACGGTCACATCGCGACGACCTATGCCTATCCCTGAAGGTGACGGC
CGCTATGTGATGGACCCTTCGCCGACGCCAAGTTGACAATCCAAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGG
CGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAG
AGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>A17-Gly11|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGCGTCCGGTACGGGTCCATTACGTAGCGCGGTTACCTTACC GGATAGGCGTAGGAGGTGCGGATATGA
CCGAAGCGCGGATGTCTTCGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCGATTACCGAGCGCATGCATGCGCCGGGTTTCGGTCTC
GCGCGGTTCCGAGGAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGAATTTGCCCGCCATGCAGCGGCGCTTCGGGA
ATCCGGTGCCTTGCTGGATCACGGTGGCGTCGGCCGTGCGGTCGTGGTGC AACGCCCGCCGCTTTGCCGAAGAATTTCCG
GATCGAGATCGCATTCTGTGTGTCGCGAACCCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG

TGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG

>A17-Gly13(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTTCGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACATAACGCGCATTACCTTCACCGGATAGGCATAGGCGGTTCGGCATATGG
CCGAAGCGCGCATATCCTCGTACAGCTTGACATGCATCAGACCATATTCACCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTC
GCGCGGCTCCAGGAAGCGCAGCGGCTCGGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACTTGGCCCGCATGCAGCGGCGCCCTCGGGA
ATCCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGACGTGGTGGTCGCGACACCAGCCGTCTTGCCGAAGAATTTTCG
GATCGAGATCGCATTGGTGGTATCGTCCGAACCCTGATCGATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>A17-Gly15(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTTCGGCGTCGGCGACGGATCCATCACATAACGCGCGTTACCTTCACCGGATACGCATACGAAGTCGCGATATGA
CCAAAGCGCGCATATCCTCGTACAGCTTGACGTGCATCAACCCATATTCGCCGAGCGCGTGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTC
GCGTGGCTCCAGGAAACGCAGTGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGTCCGGCATGCAGCGGTGCTTCGGGA
ATCCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGCGGTGCTGCTGGCAGCGCCGCGTCTTGCCGAAGAATTTTCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGCTCCGAGCCTTGGTCGATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG

>A17-Gly17(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTTCGGCATCGGTGACGGGTCCATCACATAGCGCGGTTACCTTGACCGGATAGGCGTAGGAGGTGGCGATGTG
GCCGAAGCGGGCGATGTCTTCATACAGCTTACATGCATCAGCCCGTATTCGGCGAGCGCGTGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCGAGAAAGCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGGCCTTCATGCAGCGGCGCTTCGGG
GATGCGGTGCTCTGCTGGATCACGGTGGCTTCGGTGTGTTGGTGGTCGCGACGCCTGCGGTCTTGCCAAAGAATTTTCGGATCG
AGATCGCATTCTGTTGGTGTGCTCGGACCCCTGGTCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCT
CGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACT
GGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGC
ACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGT
GGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCC

>A17-Gly21(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTTCGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACGTAACGCGCATTACCTTCACCGGATAGGCGTAGGAGGTTCGGCATATG

GCCGAAGCGCGCAATGTCTTCATACAGCTTGACGTGCATCAGGCCATATTCGCCGAGCGCATGCATACGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCCAGGAACCGCGGCGGCTCGGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGCATGCAGCGGCGCTCGGG
AATCCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTGGCATCCGCCGTGGCGGTCTGGTTGCGACGCCGGCCGTCTTGCCGAAGAATTTC
GGATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTGCCGAACCTGATCGATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>A17-Gly22|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGCTCGGCGACGGGTCCATCACATAGCGGAGTTCACCTTTACCGGATAGGCATAGGAGGTTCGGATATG
GCCGAAGCGGGCAATGTCTTCGTACAGCTTGACATGCATCAGACCATATTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCCAGGAAGCGCAGCGGCTCGGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGTCCGGCATGCAGGGGAGCTTCGGG
AATCCGGTGCCGGGTCTGGATCACAGTCGCATCCGCCGTAGCGGTCTGCTGTTGCGACGCCGGCGGTCTTGCCGAAGAATTTCC
GGATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTGCCGAACCTGGTGCATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>A17-Gly23|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGCTCGGCGACGGGTCCATCACGTAGCGGCATTCACCTTACCAGGATAGGCATAGGAGGTTCGGATATGC
CCAAAGCGCGGATATCCTCGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCATACTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTC
GCGCGGCTCCAGAAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGCATGCAGCGCCGCTTCGGGA
ATGCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGCCGTCTGCTGTTGCGACGCCGGCCGTCTTGCCAAAGAATTTCCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTGCCGAGCCCTGATCTATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>A17-Gly26|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGTGTCTCGGCGACGGGTCCATGACATAGCGGGCGTTGACCTTACCAGGATAGGCGTAGGAGGTTCGGATATG
CCAAACCGCGGATATCCTCGTAGAGCTTGACGTGCATCAGGCCATATTCGCCAAGCGGTGCATGCGTCTCGGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCGAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGGATCGGTACCTGATAGACCAGCACCTGTCCGCATGCAGCGGCGCTTCGGG
AACCCGATGCCGGGTCTGGATCACGGTGCCTTCCGTAGAGGTCTGGTTCGCGACGCTGCGGTCTTGCCGAAGAATTTTC
GGATCGAGATCGCATTGGTGGTGTCTGCCGAGCCCTGATCGATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG

GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGG
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>A17-Gly31|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAACTTTGGGGTCGGAGACGGATCCATCATGTAGCGCCCGTGCACCTTGACCGGATATGCATAGGTCGTCGGATGTGG
CCGTGGCGGGCAATATCCTCATAGAGCTTGACGTGCATCACGCCGTAATCGGGCAGCGCGTGCATCCGCCGCTTTCGGTCTC
GCGCGGCTCCAAGAACCGCAGCGGCTCGGGGATGGGAACCTGATAGACCAGGACCTGCTGCTCCTTGAGCGCGGTCTCGGGG
ATCCGGTGGCGCGTCTGTATGACCGTTGCCTCCATCGTACGGGTGGTGGTGGGACTCCGGCGGTCTTGGCGAAGAACTTGGC
GATCGACACGGCGTTGGTAGTGTGTCGGAGCCCTGATCGATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGA CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>A17-Gly35|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAAATTCGGTGTGCGGCACGGATCCATGACATAGCGAGCGTTGACCTTACC GGATAGGCGTAGGAGGTCGCGATATG
CCCGAAGCGCGCGATGTCCTCGTAGAGCTTGACGTGCATCAAGCCATATTCACCAAGCGCGTGCATACGCCTCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCAAGGAAACGCAGCGGCTCCGGGATCGGACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGCATGCAGCGGTGCTTCGGG
AATCCGATGCCGGTCTGGATTACGGTCGCGTCTTCCGTGGAGGTCGTGGTTCGCGACACCAGCGGTTTTGGCGAAGAACTTGC
GGATCGAGATCGCATTGGTGGTGTGTCGGAGCCCTGATCGATCACCTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGA CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC

>A17-Gly38|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAAATTCGGCGTCGGCGACGGTCCATCACGTAGCGGGCGTTGACCTTACC GGATAGGCGTAGGAGGTCGCGATATG
GCCGAAGCGGGCAATGTCCTCGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCATACTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGGGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCGAGGAAGCGCAGCGGTTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGCATGCAGCGGCGCCTCGGG
AATGCGGTGCCGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTGGCAGTCGTGGTGC AACACCCGCGGTCTTGGCGAAGAACTTG
CGGATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGTCGGAACCTGATCGATCACCTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGC
GGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGT
CGTGA CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA
GGCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG
CGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>A17-Gly39|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAAATTCGGCGTCGGCGATGGATCCATCACGTAGCGCGCATTGACCTTGACCGGATAGGCGTAGGCGTAGCGATATG
GCCGAAGCGCGCGATGTCCTCATAACAGCTTACGTGGATCAGGCCGTATTCGCCGAGCGCGTGCACGCGCGCGTCTCAGTCT

CGCGTGGCTCGAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACTAGCACCTGATGCGCCTGCAGCGTCGCTTCGGG
AATGCGATGCCGGTCTGGATCACCGTCGCATACCCGTGCTCGTGGTACGGCCACGCTGCCGTCTTCTCGAAGAATTTCC
GGATGGAAATCGCATTGGTCTGATCGTCGGAGCCCTGATCGATTACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>A17+Gly3(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTCGGAT
TGTCGAATTTCCGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACATAGCGCGCTTTACCTTACC GGATAGGCATAGGAGGTCCGATATGC
CCAAAGCGCGCATGTCTCTGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCATACTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTC
GCGCGGCTCCAGAAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGCCATGCAGTGGCGCCTCGGGA
ATCCGGTGC CGGTCTGGATCACGGTGGCATCCGCCGTTGCCGTCGTCGCGACGCGGCCGCTTTGCCGAAGAATTTTCG
GATCGAGATCGCATTGGTGGTGTCTCGTCCGAACCCTGGTCTATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC

>A17+Gly4(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAAGTGATCGA
TCAGGGCTCCGACGACACCACCAATGCGATCTCGATCCGCAAGTTCTTCGCCAAAACCGCTGGTGTGCGGACCACGACCTCCA
CGGAAGACGCGACCGTAATCCAGACCCGGC ATCGGATTCCCGAAGCACCGCTACATGGCGGGCAGGTGCTGGTCTATCAGGT
CCCGATCCCGGAGCCGCTGCGTTTCTTGTAGCCGCGGAGACCGAGACGAGGCGTATGCACGCGCTTGGTGAATATGGCTTG
ATGCACGTCAAGCTCTACGAGGACATCGCGCGCTTCGGGCATATCGCGACCTCTACGCCTATCCGGTGAAGGTCAACGCTCG
CTATGTCATGGATCCGTGCGGACACCGAAATTCGACAATCCGAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGC
GGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGT
CGTACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA
GGCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG
CGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG

>A17+Gly7(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAAGTGATCGA
TCAGGGTTCGACGACACAACGAATGCGATCTCGATCCGAAATTTCTTCGCCAAGACGCGGGCGTTGCGACCACGACCGCG
ACGGCCGACGCCACCGTGATCCAGACAAGGCACCGGATTCCCGAAGCGCCGCTGCATGGCGGGCAAATTCTGGTCTATCAGG
TGCCGATCCCGGAGCCGCTGCGGTTCTTGAACCGCGGAGACCGAAACCCGGCGCATGCATGCGCTCGGTGAATACGGCCT
GATGCACGTCAAGCTGTACGAAGACATCGCGCGCTTCGGTCTATCGCGACCTCTACGCCTATCCGGTGAAGGTGAACGCG
CGCTACGTGATGGACCGTACCGACGCCGAAATTCGACAATCCAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGC

GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>A17+Gly10\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTGATCGA
TCAGGGGTCTGACGACACCACCAATGCGATCTCGATCCGAAATTTCTCGGCAAGACGGCTGGTGTGCGGACCACACATCT
ACGGCCGATGCCACCGTGATCCAGACCCGGCACCGGATTCCCGAGGCACCGCTGCATGCGGGCCAGGTGCTGGTCTATCAGG
TGCCGATCCCCGAGCCGCTGCGTTTTCTGGAGCCGCGGAGACCGAGACGCGGCGCATGCATGCGCTTGGCGAGTACGGCCT
GATGCATGTCAAGCTGTACGAGGATATTGCGAGCTTCGGCCATATCGCGACCGCGTACGCTATCCGGTGAAGGTGAATGCG
CGCTATGTGATGGACCTTCGCGGACGCCGAAATTCGACAATCCAAAGATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>A17+Gly11\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTTCGGCGTCGGCGACGGATCCATCACATAACGCGCGTTCACCTTCACCGGATACGCATACGAAGTCGCGATATGA
CCAAAGCGCGCATATCCTCGTACAGCTTGACGTGCATCAACCCATATTCGCCGAGCGCGTGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTC
GCGTGGCTCCAGGAAACGCAGTGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGTCCGGCATGCAGCGGTGCTTCGGGA
ATCCGGTGC CGGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGCGGTGCTGCTTGCAGCGCCGGCCGCTTTCGCCGAAGAATTTGCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGCTCCGAGCCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGA CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>A17+Gly13\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTTCGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACATAGCGCGCTTGACCTTCACCGGATAGGCATACGAAGTCGCGATATG
GCCAAAGCGCGCAATGTCTTCGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCGTATTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGAGGCTCCAGGAATCGTAACGGCTCGGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGCATGCAGCGGCGCCTCGGG
AATCCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTGGCATCCGCCGTAGCGGTGCTGCTTTCAACACCGGCCGCTTTCGCCGAAGAATTTCC
GGATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGCTCCGAACCCTGGTCTATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>A17+Gly14\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTTCGGCGTCGGCGACGGATCCATCACATAGCGCGCATTACCTTCACCGGATACGCATAGGAGGTGCGGATATGG
CCGAAGCGCGCAATGTCTTCGTATAGCTTGACGTGCATCAGGCCGTATTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTC
GCGCGGTTCCAGGAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGGCCGGCATGCAGCGGGGCTCGGGA

ATCCGGTGCCGGGTCTGAATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGCTGTCTCGTTGCGACGCCGGCCGCTTGGCCGAAGAATTTCCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTGCCGAACCTTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGA CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAAGCGCGGC
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>A17+Gly15\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTCGGAT
TGTCGAATTTGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACATAGCGCGCATTACCTTACC GGATAGGCATAGGAGGTGCGGATATG
GCCGAAGCGGGCGATGTCTCTGACAGCCTGACATGCATCAGGCCATATTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCCAGAAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGCATGCAGCGGTGCTTCGGG
AATCCGATGCCGGTCTGGATTACGGTGGCATCCGCCGTTGCAGTCGTCTTGGCAGCCGGCGTCTTGGCCGAAGAATTTTC
GGATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTGCCGAACCTGGTCGATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGA CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAAGCGCGGC
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC

>A17+Gly18\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTGGTGTCTGGCGACGGATCCATCACATAGCGCGGTTACCTTACC GGATACGCATACGCGGTGCGGATATGA
CCGAAGCGCGGATATCTCTGACAGCTTGACGTGCATCAGGCCATATTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTC
GCGTGGCTCCAGGAAACGCAGTGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGCATGCAGCGGGCCTTCTGGT
ATCCGGTGCCGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGCAGTCGTCTTGGCAGACCAGCCGCTTGGCCGAAGAATTTTCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTGCCGAGCCCTGGTCTATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGA CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAAGCGCGGC
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC

>A17+Gly19\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTGATCGA
CCAGGGCTCCGACGACACCACCAACGCGGTGTCGATCCGCGCATTCTTCGCCAAGACCGCAAACGTGCGCACCAACACGCGC
ACCGCGATGCGACCATCATCCAGACCCGCCACCGGTGCCGAAACCACGCTCGCCAAGGGCCAGGTGCTGGTCTACCAGG
TGCCGATCCCCGAGCCGTTGCGCTTCTCAGCCGCGGAGACCGAGACGCGCCGATGCACGCGCATGCCGATTACGGCCT
GATGCATGTGAAGCTCTACGAGGACATCGCGGTCACGGCCATATCGCGACGACCTATGCGTATCCGTC AAGGTGATGAC
CGCTACGTGATGGATCCTTCGCCGACGCCGAAATTCGACAATCCAAAGATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTGA CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTT

>A17+Gly21\|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTGATCGA
TCAGGGCTCCGACGACACCACCAATGCGATTTGATCCGGAAATTTTCGCCAAGACAGCTGGCGTTGCGGCCACGACTTCCA
CGGAAGACGCGACCGTGATCCAGACCCGGCATCGGATTCCCGAAGCGCCGCTGCATGGCGGGCAGGTGCTGGTCTATCAGGT
CCCGATCCCGGAGCCGCTGCGCTTCCTCGAGCCACGCGAGACCGAGACGAGGCGCATGCACGCGCTTGGCGAATATGGCCTG
ATGCATGTCAAGCTCTACGAGGACATTGCGCGCTTTGAGCACATCGCGACCTCTACGCCTACCCGGTGAAGGTGAATTTCCG
CTACGTCATGGATCCGTGCGGACACCGAAATTCGACAATCCAAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGC
GGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGT
CGTGAATGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA
GGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG
CGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC

>A17+Gly22\|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGTGTGCGCGAAGGGTCCATCACATAGCGCGCATTACCTTACC GGATAGGCATAGGAGGTGCGGATATGC
CCAAAGCGCGCATGTCTCGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCGATTTCGCCGAGTGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTTTC
GCGCGGTTCCAGGAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCCCGCCGGCATGCAGCGGTGCTTCGGGA
ATCCGGTGGCGCGTCTGGATCACGGTGGCATCCGCCGTTGCAGTCGTGTCGCGACGCCGGCCGCTTGTCTGAAGAATTTTCG
AATCGAGATCGCGTTCGTGTCGTCCGAACCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTG
TGAATGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>A17+Gly23\|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGTGTGCGCGACGGGTCCATCACATAGCGCGCATTACCTTGACCGGGTAGGCATAGGAGGTGCGGATGTG
GCCAAAGCGCGCAATGTCTCGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCATACTCGCCGAGCGCATGCATGCGACGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCCAGGAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGTCCCGCATGCAGCGGCGCCTCGGG
AATGCGGTGCCGAGTCTGGATCACGGTGGCATCCGCCGTTAGCCGTCGTGTTGCGACACCCGCGGTCTTGCCGAAGAATTTCC
GAATCGAGATCGCGTGGTGGTGTGTC
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTG
GTGAATGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCG
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>A17+Gly24\|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TGTCGAATTTCCGGTGTGCGCGACGGGTCCATCACATAGCGCGCATTACCTTGACCGGGTAGGCATAGGAGGTGCGGATGTG
GCCAAAGCGCGCAATGTCTCGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCATACTCGCCGAGCGCATGCATGCGACGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCCAGGAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGTCCCGCATGCAGCGGCGCCTCGGG
AATGCGGTGCCGAGTCTGGATCACGGTGGCATCCGCCGTTAGCCGTCGTGTTGCGACACCCGCGGTCTTGCCGAAGAATTTCC

GAATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTGTCGTCGAAACCTTGATCGATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG

>A17+Gly27\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTGATCGA
TCAGGGTTCGACGACACAACGAATGCGATCTCGATCCGAAATCTTCGGCAAGACGGCGGGCGTTGCGACCACGACCGCG
ACGGCCGACGCCACCGTGATCCAGACAAGGCACCGGATTCCCGAAGCGCCGCTGCATGGCGGGCAAATCTGGTCTATCAGG
TGCCGATCCCGAGCCGCTGCGGTTCCCTGAACCGCGGAGACCGAAACCCGGCGCATGCATGCGCTCGGTGAATACGGCCT
GATGCACGTCAAGCTGTACGAAGACATCGCGCGCTTCGGTCATATCGCGACCTCCTACGCCTATCCGGTGAAGGTGAACGCG
CGCTACGTGATGGACCCGTCGCCGACGCCGAAATTCGACAATCCAAAGATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG

>A17+Gly29\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTAATCGA
CCAGGGCTCCGACGACACCACCAATGCGATCTCGATCCGAAATCTTCGGCAAGACCGCGGGTGTGCAACGACGACTGCC
ACGGCGGATGCCACCGTGATCCAGACCCGGCACCGGATTCCCGAAGCGCCGCTGCATGGCGGGCAGGTGCTGGTCTATCAGG
TGCCGATCCCCGAGCCGCTGCGTTTTCTGGAGCCGCGGAGACCGAGACGCGGCGCATGCATGCGCTCGGCGAGTATGGCCT
GATGCACGTCAAGCTGTATGAGGATATCGCGCGCTTCGGCCATATCGCGACCGCATATGCCTATCCGGTGAAGGTGAATGCG
CGCTATGTGATGGACCCGTCGCCGACGCCGAAATTCGACAATCCAAAGATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>A17+Gly32\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGTGTGCGGCGACGGGTCCATGACATAGCGGGCGTTGACCTTACCGGATAGGCGTAGGAGGTGCGGATGTG
CCCAAACCGCGGATATCCTCGTAGAGCTTGACGTGCATCAGGCCATATTCGCCAAGCGCGTGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCGAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGGATCGGTACCTGATAGACCAGCACCTGTCCGCATGACGCGGCGCTTCGGG
AACCCGATGCCGGGTCTGGATCACGGTTCGCTTCCGTAGAGGTGCTGGTTCGCGACGCTGCGGTCTTGGCGAAGAATTTTC
GGATCGAGATCGCATTGGTGGTGTCTGTCGGAGCCTTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>A17+Gly33\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGTGTGCGGCACGGGTCCATGACATAGCGGGCGTTGACCTTACC GGATAGGCCGTAGGAGGTGCGGATGTG
CCCAAACCGCGGATATCCTCGTTGAGCTTGACGTGCATCAGGCCATATTCGCCAAGCGCGTGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCGAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGGATCGGTACCTGATAGACCAGCACCTGTCCGCCATGCAGCGGCGCTTCGGG
AACCCGATGCCGGTCTGGATCACGGTCCGCTTCCGTAGAGGTGCTGGTTCGCGACGCCTGCGGTCTTGCGGAAGAATTTTC
GGATCGAGATCGCATTGGTGGTGTGTCGTCGGAGCCTTGGTCGATCACCTTAAGCCGAATTCGAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>A17+Gly34\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGCGTTCGGGCACGGGTCCATCACGTAACGCGCATTACCTTACC GGATAGGCCGTAGGAGGTGCGGATATG
GCCGAAGCGCGCAATGTCTTCATACAGCTTGACGTGCATCAGGCCATATTCGCCGAGCGCGTGCATGCGCCGTGTCTCGGTCT
CGCGGGGCTCCAGGAACCGCAGCGGCTCGGGAATCGGCACCTGATAGACCAGTACCTGCCCCGCATGCAGCGGCGCTTCGGG
AATCCGGTGCCGGTCTGGATCACGGTGGCATCCGCCGTGGCGTCTGGTTCGCGACGCCCGCGTCTTGCCGAAGAATTTCC
GGATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGTCGTCGACCCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCGAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>A17+Gly39\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTAATCGA
TCAGGGCTCGGACGACACCACCAACGCGATCTCGATCCGAAAATCTTCGGCAAGACGGCCGGCGTTGCGACGACGACTGCA
ACGACGGACGCCACCGTATCCAGACCCGGCACCGCATTCCCGAAGCCCCGCTGCATGCGAGGCAGGTGCTGGTCTATCAGG
TGCCGATCCCGAGCCGCTGCGGTTCTGGAGCCGCGGAGACCGAGACGCGGCGTATGCATGCGCTCGGTGAATACGGCCT
GATGCACGTCAAGCTGTACGAGGACATCGCGCGCTTTGGCCATATCGCGACCTCCTATGCTTATCCGGTGAAGGTGAATGCGC
GCTATGTGATGGACCCGTCGCCGACGCCGAAATTCGACAATCCGAAAATGAAGCCGAATTCGAGATATCCATCACACTGG
CGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAG
AGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC

>NM-Gly3\ (M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGCGTTCGGCGATGGGTCCATCACGTAGCGCGCATTACCTTACC GGATAGGCCGTAGGAGGTGCGGATATGG
CCAAAGCGCGCAATGTCTCGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCGATTCGGCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTC
GCGCGGCTCCAGGAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCCGCATGGAGCGGCGCTCCGGGA
ATCCGGTGCCGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGCCGTCGTCGTTGCGACGCCGGCCGCTTTGCCGAAGAACTTTCG

GATCGAGATCGCATTGGTGGTATCGTCCGAACCCTGGTCTATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACAACCTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGA CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>NM-Gly4|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTGGCGTTGGTGAGGGATCCATCACGTAACGTGCATTCACCTTCACGGGATAAGCGTAAGACGTGCGCAATATGC
CCGAACCGTGCATGTCTCTGTAGAGCTTGACATGCATCAGGCCATATTCGGCCAGCGCATGCATGCGCCGCGTTTCGGTCTC
GCGGGGCTCCAGGAAGCGCAGCAGCTCCGGAATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGGCCCTCGTGCAGCGTCGCCCTCGGGA
ATGCGGTGCCGGGTTGAATGACGGTCGCCTCCGCGGTGAGGTGCTGTGGCAACGCCCGCGTCTTGCCGAAGAATTTCCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGCTCGGAGCCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACAACCTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGA CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM-Gly6|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAAGTGATAG
ACCAGGGCGCCGACGATACGACCAACGCCGTCTCCATCCGCAAGTTCTTCGAGAACACCGCCGGGATCGCCACCACCACCGC
GACCGCCGAAGCGACCGTATCCAGACCCGCCACCGTATCCCCGAAGCGCCGCTGGGCGAGGGCAGATCCTTGTCTATCAG
GTGCCTATCCCGGAGCCTTTACGGTTCCTTGAGCCGCGGAGACCGAAACACGCCAGATGCATGCGCTGGAGGACTATGACC
TCATGCATGTGAAGCTCTATGAGGATATGCCCCGCGACGGCCACATCGCGACGACCTATGCCTATCCGGTGAAGATCGAGGG
ACGCTATGTCATGGACCTTCGCCCATCCCGAAATTCGACAATCCAAAGATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACAACCTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>NM-Gly7|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTGGTGTGCGCGAAGGGTCCATCACGTAACGGGCGTTGACCTTGACCGGATAGGCATAGGAGGTGCGGATATG
GCCGAAACGCGCGATGTCTCTGTACAGCTTCACGTGCATCAAGCCATATTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCCAGGAATCGCAGCGGTTCCGGAATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGGATGCAGCGGCGCCTCGGG
AATCCGGTGTGCGTCTGGATCACGCTCGCCTTGCCGTAGAGGTGGTGGTGGCAACACCGGCGGTTTTGGCAAAGA ACTGG
CGGATCGAAATCGCGTTGGTGGTGTGCTCCGATCCCTGATCGATTACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACAACCTGGC
GGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGT
CGTGA CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA
GGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG
CGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM-Gly9|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAAGTAATCGA
CCAGGGCGCCGACGACACGACCAACGCCGTCTCGATCCGCCATTTCTTCGAGCGCACGACCGGGCGTTGCGACAACCGAGCAG
ACTGCCGACGCGAGCATCATCCAGACGCGCCATCGCATCCCCGAAAACGCCGTGCGCGAAAACAGATCATCGTCTATCAGG
TGCCGATCCCCGAGCCGCTGCGTTGGATCGAGCCGCGGAGGTCGAGACACGCAAGATGCACGCGCTCGCGGAGTACGGGCC
GATGTATGTCCGCCTTACGAGGACATCGCGCAATTCGGCCAGGTGACGACGGCCTATGACTACCCGGTGGTGGTAAACGGC
CGCTATTTGATGCGGCCCTCGCCGATCCCCGAAATTCGACAATCCAAAGATGAAGCCGAATTCGAGATATCCATCACACTGG
CGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAG
AGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM-Gly10|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTTCGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACATAGCGTGCCTTCACTTTCACCGGATAAGCATAACGACGTCGCGATATGA
CCAAAGCGCGGATATCCTCGTACAGTTTGACGTGCATCAGGCCGATTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTC
GCGCGGTTCCAGGAACCGCAGCGGCTCGGGAATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGTCCCGCATGCAGCGGCGCTTCGGGA
ATCCGGTGCCGGTCTGGATCACGGTGGCATCCGCCGTCGAGGTCGTGGTTCGCGACACCAGCGGTCTTGCCGAAAAACTTCC
GGATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTGTCGGAGCCCTGGTCGATCACCTAAGCCGAATTCGAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>NM-Gly11|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAAGTAATCGA
TCAGGGCTCCGACGATACCACCAACGCGATCTCGATCCGAAAATTTCTTCGGCAAGACTGCTGGCGTCGCGACCACAACCTTCG
ACGGCGGATGCAACCGTGATCCAGACCCGGCACCGGATTCCCGAAGCGCCGCTGCATGGCGGGCAGATCCTGGTCTACCAGG
TGCCGATCCCAGAGCCGCTGCGGTTCTCGAGCCGCGGAGACCGAGACGCGGCGCATGCATGCGCTTGCGAATATGGCCT
GATGCATGTCAAGCTGTATGAAGACATCGCGCGCTTCGGCCACATCGCGACTTCTACGCCTATCCGGTGAAGGTGAACGCGC
GCTATGTGATGGACCCGTCGCCGACACCGAAAATTCGACAATCCGAAGATGAAGCCGAATTCGAGATATCCATCACACTGG
CGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAG
AGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG

>NM-Gly13|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTCGGAT
TGTCGAATTTTGGCGTCGGCGAAGGGTCCATCACATAGCGCGCATTCACCTTACCAGGATATGCGTAAGAGGTGCGGATATGG
CCGAAGCGCGCAATATCCTCGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCGACTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTC
CCTAGGCTCCAGGAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCTGCATGCAGCGGCGCCTCGGGA
ATCCGGTGCTGGTCTGGATCACGGTGGCATCCGCCGTTGAGGTCGTGGTTGCGACGCCGGCCGCTTGCCGAAGAACTTTCG

GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTGTCGGATCCCTGGTCTATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGA CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>NM-Gly14(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAATTTGGCGTCGGCGAAGGGTCGCTCAGTATCTGGCGTTCACCTTCACCGGATAGGCGTAGGTGGTGGCAATGTGG
CCGTGGCGGGCGATGTCTTCATACAGTTTGACATGCATCAGCCGTAATCGGCCAGTGCCTGCATTTGCCGGGTTTCCGTCTC
GCGCGGCTCGAGAAAAGCGCAGCGGCTCCGGAATGGGAACCTGGTAGACCAGGACTTGATGCTCGCCGAGTGGCGTTTCGGGA
ATCCGGTGCCTCGTCTGGATCACCGTCGCCTCGGCGGTGCGCGTGGTGGTGGCAACGCCCGCGTCTTAGCAAAAAACTTGCG
GATCGACACCGGTTGGTGGTGTCTGTCGGAGCCTTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGA CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>NM-Gly15(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TGTCGAATTTGGCGTCGGCGAAGGATCCATCACATAGCGGGCGTTCACCTTCACCGGATAGGCGTAAGCGGTCGCGATATG
GCCGAAACGCGCGATGTCTCTGTAGAGCTTGACGTGCATCAGCCATATTCGCCGAGTGCATGCATGCGCCGGGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCGAGGAAGCGAAGGGGCTCGGGGATCGGAACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGCATGCAGCGGCGCTTCCG
GAATCCGATGCCGGGTCTGGATCACCGTTGCATCGGACGTGCTGGTGGTGGTGGCAACGCCCGCGTCTTGCGGAAGAACTT
GCGGATGGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTGTCGGAACCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGG
CGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAG
AGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG

>NM-Gly20(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACGTAGCGCGCATTCACCTTCACCGGATAGGCGTAGGAGGTGCGGATATG
GCCAAGCGCGCAATGTCTCTGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCGTATTCGGCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCCAGGAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGCATGGAGCGGCGCCTCGGG
AATCCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGCCGTCGTCGTTGCGACGCCGGCCGTCTTGCCGAAGAACTTTC
GGATCGAGATCGCATTGGTGGTATCGTCCGAACCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM-Gly25(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TGTCGAACTTCGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACATAGCGCGCTTGACCTTACCGGGTAGGCGTAGGAGGTGCGGATGTG
GCCGAAGCGCGGATGTCTCGTAGAGCTTGACGTGCATCAGCCGTATTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCGAGGAAGCGCAGCGGCTCGGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCTGCCTTCAGCGCCGCCTCGGG
AATGCGGTGGCGGGTCTGGATGACGGTTGCGTCGCTGGTCGACGTGCTGTTCAACGCCGGCGGTCTTGGCGAAGAATTCC
GGATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGTCGTCGGAACCTGGTCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>NM-Gly27(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TGTCGAAATTCGGCGTTGGTGAGGGATCCATCACGTAACGTGCATTACCTTACGGGATAAGCGTAAGACGTGCAATATGC
CCGAACCGTGCGATGTCTCGTAGAGCTTGACATGCATCAGGCCATATTCGCCAGCGCATGCATGCGCCGCGTTTCGGTCTC
GCGGGGCTCCAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGAATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGGCCTTCGTGCAGCGTCGCTCGGGA
ATGCGGTGCCGGGTTGAATGACGGTCGCCTCCGCGGTGAGGTGCTGCTGGCAACGCCCGCGTCTTGGCGAAGAATTTCCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGTCGTCGGAGCCCTGGTCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC

>NM-Gly31(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTGGAT
TGTCGAAATTCGGCGTTGGTGAGGGATCCATCACGTAACGTGCATTACCTTACGGGATAAGCGTAAGACGTGCAATATGC
CCGAACCGTGCGATGTCTCGTAGAGCTTGACATGCATCAGGCCATATTCGCCAGCGCATGCATGCGCCGCGTTTCGGTCTC
GCGGGGCTCCAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGAATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGGCCTTCGTGCAGCGTCGCTCGGGA
ATGCGGTGCCGGGTTGAATGACGGTCGCCTCCGCGGTGAGGTGCTGCTGGCAACGCCCGCGTCTTGGCGAAGAATTTCCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGTCGTCGGAGCCCTGATCGATTACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACT

>NM-Gly32(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TGTCGAAATTCGGCGTCGGCGACGGATCCATCACGTAACGGCCCTGCACCTTGACCGGATAATCATAGGTCGTGGCGATATGG
CCGTTGCGCGCATGTCTCGTAGAGCTTACATGCATGAGGCCGATTCTCAAGCGCGTGCATCTTCTGGTCTCCGTCTCG
CGCGTTCGAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGCGTCGGCACCTGGTAGACCAGCACCTGATTGGCCGCGAGCTTTTGTCTCCGTA
TCCTGTGGCGCGTCTGGATGATCGTCGTTCCGCCGTACGCGTCGTACCGCAACATTGGCGACCTTCTGGAAGAACGCGCGG

ATGGAGACGGCGTTGGTCGTGTCGTCCGCCCCCTGGTCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGC
CGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT
GACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC
CCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCGCATTAAAGCGCGGGC
GTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTT

>NM-Gly33(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTTGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACATAGCGTCGTTACCTTCACCGGATAGGCGTAGGAGGTGCGGATATGG
CCAAAGCGCGCAACGTCCTCGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCGATTTCGCCGAGCGCATGCATGCGACGCGTCTCAGTCTC
GCGCGGCTCCAGGAACCGCAGCGGCTCGGGGATCGGCACCTGATAGTCCAGCACCTGCCGGCATGCAGCGGGCGTTCGGGA
ATCCGGTGACGGGTCTGGATCACGGTGGCGTCGGCCGTGGAAGTCGTGGTTGCGACGCCGGCCGTCTTGCCGAAGAACTTTC
GGATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGTCGTCGCCACCCCTGGTCTATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC

>NM-Gly36(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTGGAT
TGTCGAACGCCGGTATGGGACTCGGGCAGATCAAATATCGCTCGTTGACCCTGACCGGATAGTCGTAAGTGGTCGAGATCTGA
CCGAGCCGCGCCACGTCCTCGTAAAGTTTACATGCATCAACCCATAATCCGACAACGCATGCATCCGTTTCGTCTCCACCCT
ACTGGGCTCCAGACGAAACAGCGGTTCCGGTTGCGGCACCTGGTAAACGATGATCTGATTTTCTGCAACGGTCTTCCGGGA
TACGGTGCCCGCTCTGGATGACGGTTGCATCGGCGGTGTGCGTCGTGGTGCGGACCCCCGGGTGCGGGCAGAGAAGTCCG
GATCGATACCGGTTCTGGTGTGTCGTCGGCGCCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>NM-Gly38(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TATCGAATTTTCGGCGTTGGTGAGGGATCCATCACGTAACGTGCATTACCTTCACGGGATAAGCGTAAGACGTCGCAATATGC
CCGAACCGTGCGACGTCCTCGTAGAGCTTGACATGCATCAGGCCATATTCGGCCAGCGCATGCATGCGCCGCGTTTCGGTCTC
GCGGGGCTCCAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGAATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGGCCTTCGTGCAGCGTCGCTCGGGA
ATGCGGTGCCGGGTTTGAATGACGGTCGCCTCCGCGGTGAGGTCGTGCTGGCAACGCCCGCGTCTTGCCGAAGAATTTCCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGTCGTCGGAGCCCTGGTCGATTACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>NM-Gly39(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAACTTTGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACGTAGCGCGCATTACCTTCACCGGATAGGCGTAGGAGGTTCGGATATG
GCCAAAGCGCGCAATGTCTCTGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCGTATTCGGCGAGCGCATGCATGCCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCCAGGAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCCGCATGGAGCGGGCCTCGGG
AATCCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGCCGTGCTCGTTGCGACGCCGGCCGTCTTGCCGAAGAACTTTC
GGATCGAGATCGCATTGGTGGTATCGTCCGAACCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAAGCGCGG
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC

>NM-Gly40(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTGATCGA
CCAGGGTTCGGACGACACCACCAACGCAATCTCGATTGAAAAGTTCTTCGGCAAGACGGCCGGTGTGCGGACCACGACCTCA
ACGGCGGACGCCACCGTGATCCAGACCCGGCACCGGATTCCCGAAGCGCCGCTGCATGCGGGGACGGTGTGGTCTATCAGG
TGCCGATCCCCGAACCGTGTGCGTTCTTGAGGCCGCGGAGACCAGACGCGTGCATGCATGCGCTCGGCAATACGGCCT
GATGCACGTCAAGCTGTATGAGGATATCGCACGCTTCGGCCATATCGCGACGTCCTACGCTTATCCGGTGAAGGTGAATGCGC
GCTATGTGATGGACCCTCGCCGACGCCGAAATTCGACAATCAAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGG
CGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAG
AGCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAAGCGCG
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly1(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTTGGAT
TGTCGAAATTTGGCGTCGGTGATGGGTCCATCACGTAGCGGGCATTGACCTTGACCGGATAAGCATAGGACGTTCGGATGTG
ACCGAAGCGGGCGATGTCTCTGTACAGCTTGACGTGCATCAGCCATATTCGGACAGCGCATGCATGCCGCGTGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCGAGGAAACGCAGCGGCTCCGGGATTGGCACCTGGTAGACCAGCACCTGCTTGTGTCGAGCGGCTCCTCCGG
AATGCGATGGCGGGTTTGAATTACGGTGCATCGGCGGTGCGCGTCTGCACGCCGGCGGTCTTCTCGAAGAACTTGC
GGATCGAGATCGCGTTCGTGGTGTGTCGGAGCCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAAGCGCGG
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>NM+Gly2(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAAATTTGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACGTAGCGCGCATTACCTTCACCGGATAGGCGTAGGAGGTTCGGATATGG
CCAAAGCGCGCAATGTCTCTGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCGTATTCGGCGAGCGCATGCATGCCCGCGTCTCGGTCTC
GCGCGGCTCCAGGAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCCGCATGGAGCGGGCCTCGGGA
ATCCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGCCGTGCTCGTTGCGACGCCGGCCGTCTTGCCGAAGAACTTTCG

GATCGAGATCGCATTGGTGGTATCGTCCGAACCCTGGTCGATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGA CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGC
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly4(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TATCGAATTTCCGGCGTCGGCGAGGGGTCCATCACATAACGCGCATTACCTTCACCGGATAGGCGTAAGAGGTGCGGATGTG
GCCGAAGCGCGGATGTCTCTGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCATATTCGCCAAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCCAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGGATCGGTACCTGATAGACCAGCACCTGCCCCGCATGCAGCGGCGCCTCGGG
AATGCGGTGCCGGTCTGGATCACGGTGGCGTCGGCCGTCGAGGTCGTGGTCGCGACACCGGCCGCTTGGCCGAAGAATTTTC
GGATCGAAAATCGGTTCTGGTGTCTGCCAGCCCTGATCGATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGA CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>NM+Gly6(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TGTCGAACTTCGGAGTGGGCGAGGGATCGGTGACGTAGCGGCCGTCGACTTTCACCGGATAGGCATAGGTCGTTGCGATGTG
CCCGTGTGCGGATGTCTTCATAAAGCTTCACATGCATCAGGCCGTAATCGGCGAGGGCGTGCATGCGGCGTGTTCGGTCT
CGCGCGGCTCGAGAAAGCGCAGCGGTTCTGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGATGTTGCGCGAGCGGCGTTCCGG
AATGCGATGGCGGCTCTGGATGACGGTGGCGTTCTCCGTA CTGGTCTGGTCTGCGACATTGGCGGTCTCCTTGAAGAAGCTAC
GGATTGATACGGCGTTGGTTGTGTCTCGGCGCCTTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGA CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>NM+Gly11(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTCGGAT
TGTCAAA CTTCGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACATAGCGGGCGTTGACCTTGACCGGGTAGGCGTAAGACGTGGCGATGTG
GCCGAAGCGCGGATGTCTTCGTACAGCTTCACATGCATCAGGCCATATTCGGACAGCGCGTGCATGCGCCGTCGTCGGTCT
CACGCGGCTCGAGGAAGCGCAAGGTTCCGGTATCGGCACCTGGTAGACCAGCACCTGCTTGTCTGTCAGCGGCTCTCCGG
AATGCGGTGGCGAGTCTGGATCACCGTGGCGTCGCCGGTCGCGGTCGTGGTTTTACACCCGCGGTCTTCTCGAAGAATTTGC
GGATGGAGATCGCATTCTGGTGTCTGTCGGAGCCCTGATCGATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGA CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly13(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAAGTGATCGA
TCAGGGCTCCGACGACACTACCAATGCGATCTCGATTCCGGAAGTTCTTCGCCAAGACCGCTGGTGTGCGGACCACGACCTCCA
CGGAAGACGCGACCGTAATCCAGACCCGGCATCGGATTCCCGAAGCGCCGCTGCATGGCGGGCAGGTGCTGGTCTATCAGGT
CCCGATCCCGGAGCCGCTGCGTTTCCTTGAGCCGCGGAGACCGAGACGAGGCGTATGCACGCGCTTGGCGAATATGGCC
TGATGCACGTCAAGCTCTACGAGGACATCGCGCGCTTCGGGCATATCGCGACCTCGTACGCCTATCCGGTGAAGGTCAACGCC
CGATACGTACGGATCCGTGCGCGACACCGAAATTCGACAATCCAAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly14(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAAGGTGATCGA
CCAGGGTTCGACGACACCACCAACGCGGTGTCGATCCGCAAGTTCTTCAGCAAGACCGCGGGCGTGGGACGACGACGTCA
ACACCGGAGGCGACCGTCAATCCAGACGCACCACCGGGTGCCGGAGACACCCCTCACCGATGAGCAGGTGCTGGTCTATCAGG
TGCCGATCCCCGAGCCGCTGCGGTTCTCTGAGCCGCGGAGACCGAAACCCGCCGATGCACGCCCCTGCGGAATACGGCC
TGATGCACGTGAAGCTGTACGAGGACATCGCGCAGCACGGTCATATCGCAACGACCTACGCCTATCCTGTCACGGTCGCTGG
CCGCTACGTGATGGATCCCTCGCCGATCCCGAAGTTCGACAATCCAAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTT

>NM+Gly15(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTCGGTGTGCGGACGGATCCATGACGTATCGGGCGTTGACCTTCACCGGATAGGTGTACGAGGTGCGGATATGC
CCGAAGCGCGGATGTCTCGTAGAGCTTGACGTGCATCAGGCTATATTCGCCAAGCGCGTGCATACGCCCTCGTCTCGGTCTC
GCGCGGCTCAAGGAAACGCAGCGGCTCCGGGATCGGGACCTGATAGACCAGCACCTGCCCGCCATGCAGCGGCGCTTCGGGA
ATCCGATGCCGGTCTGGATTACGGTCTCGCTTCCCGTGGAGGTCGTGGTCTCGGACACCAGCGGCTTGGCGAAGAACTTCCG
AATCGAGATCGCATTGGTAGTGTGTCGTCGAGCCCTGATCGATCACCTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGAATGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly16(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TGTCGAATTCGGCGTTCGGGACGGTCCATCACATAGCGCGCATTGACCTTGACCGGATAGGCATAGGCAGTTCGGATGTG
GCCGAAGCGGGCGATATCTTCGTACAGCTTGACATGCATCAGGCCGTATTCGGCGAGCGCATGCATGCGCCGCTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCGAGGAAGCGCAGCGGTTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCACCACCTGACCGCATGCAGCGGCGCCTCGGG
AATCCGGTGCCGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCGGTCGCGGTTGGTGGTGGCGACCGCGGCTTTCGCCAAGAATTTT

CGGATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTCGTCCGAACCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGC
GGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGT
CGTGACTIONGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA
GGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG
CGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly17(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTAATCGA
TCAGGGTTCGACGACACCACGAATGCGATCTCGATCCGAAAATTTCTTGGCAAGACCGCAGGCGTCGCGACTACCACCGAC
ACCACCGAAGCCACCGTGATCCAGACGAGGCACCGCATCCCCGAAGCGCCGCTGCATGAAGGCCAGGTGCTGGTCTATCAGG
TGCCGATCCCGAGCCGCTGCGCTTCTCGAGCCGCGGAGACCGAGACGCGGCGCATGCACGCGCTCGCGAATACGGGG
TGATGCATGTAAGCTGTATGAAGACATCGCCCGCTTCGGCCACATCGCCACCTCCTACGCCTATCCGGTCAAGGTGAACACC
CGCTATGTGATGGACCGTCACCGACGCCGAAATTCGACAATCCGAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTGACTIONGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly18(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTGATCGA
CCAGGGTTCGACGACACCACCAACGCGATCTCGATCCGAAAAGTTCTTCGGCAAGACGGCCGGCGTCGCAACGACGACTGCA
ACGGCGGATGCCACCGTGATCCAGACCCGGCACCGGATCCCCGAAGCTCCGCTGCATGCCGGGCGAGGTGCTGGTCTATCAGG
TGCCGATCCCGAGCCATTGCGCTTCTCGAGCCGCGGAGACCGAGACGCGGCGCATGCATGCGCTCGCGAATACGGCC
TGATGCACGTCAAATATATGAAGACATTGCGCGCTTCGGCCATATCGCGACCTCCTATGCCTATCCGGTGAAGGTGAACCGG
CGTTATGTGATGGACCGTCGCCGACGCCGAAATTCGACAATCCAAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTGACTIONGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>NM+Gly19(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TGTCGAATTTCCGGTGTGCGGACGGGTCCATCACATAGCGTGCGTTGACCTTGACCGGATAGGCATAGGACGTCGCGATGTGA
CCGAAGCGGGCAATGTCCTCGTAAAGCTTGACGTGCATCAGCCCGTACTCAGACAGCGCATGCATGCGACGTGTCTCGGTCTC
GCGCGCTCGAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGAATCGGCACCTGGTAGACCAGCACCTGCTTGTCTGTCAGCGGCTCCTCCGGA
ATGCGATGGCGGGTTGAATTACGGTCGCATCGGCGGTGCGCGTCTGCTGTCACGCCGGCGGTCTTCTCGAAGAATTTGCG
GATCGAGATCGCGTTCGTGGTGTCTGTCGAGCCCTGATCGATCACTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGACTIONGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly20(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTGATCGA
TCAAGGCGCTGATGATACGACCAACGCGGTGTCCATACGCCGGTTCTTCGCGCGAACTGCCGGCGTGCAGACCACGACTTTTA
CCGCGGATGCCACAGTGATACAGACGCGGCACCGGATTCCGGAAAAGACGCTGAGAGACGATCAGATCATCGTTTATCAGGT
GCCGCAGCCGGAACCATTGTTTCGATTGGAACCTTCACGCATCGAGACGCGTCGCATGCATTGCTGGCGGATTACGGGC
TGATGCATGTGAACTGTATGAGGACATTGCTCGGTTCCGGCAAATATCGATCAGCTGTGACTATCCGGTGATGGTGAATCAC
CGCTACCTGATGTCGCCTAGCCCGATACCTGCGTTCGACAATCCAAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGG
CGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAG
AGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>NM+Gly21(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TGTCGAATTTCCGGCGTTGGTGAGGGATCCATCACGTAACGTGCATTACCTTCACGGGATAAGCGTAAGACGTGCAATATGC
CCGAACCGCGCGATGTCTCTGATAGAGCTTGACATGCATCAGGCCATATTCGGCCAGCGCATGCATGCGCCGCGTTTCGGTCTC
GCGGGGCTCCAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGAATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGGCCTTCGTGCAGCGTCGCCTCGGGA
ATGCGGTGCCGGGTTTGAATGACGGTCGCCTCCGCGGTGAGGTCGTGCTGGCAACGCCCGCGTCTTACCGAAGAATTTCCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGCTCGGAGCCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGAATGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly22(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGCGTTGGTGAGGGATCCATCACGTAACGTGCATTACCTTCACGGGATAAGCGTAAGACGTGCAATATGC
CCGAACCGTGCAGATGTCTCTGATAGAGCTTGACATGCATCAGGCCATATTCGGCCAGCGCATGCATGCGCCGCGTTTCGGTCTC
GCGGGGCTCCAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGAATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGGCCTTCGTGCAGCGTCGCCTCGGGA
ATGCGGTGCCGGGTTTGAATGGCGGTGCCTCCGCGGTGAGGTCGTGCTGGCAACGCCCGCGTCTTGC CGAAGAATTTCCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGCTCGGAGCCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGAATGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly23(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGCGTCGGCGAAGGGTCCATCACGTAGCGAGCGTTCACCTTTACGGGATATGCATAGGAGGTGGCGATGTG
GCCGAAGCGGGCAATGTCTCATAAAGCTTCACGTGCATCAACCCGTATTCGCCGAGCGCATGCATGCGGCGCGTTTCGGTCT
CACGCGGCTCCAGAAACCGCAGCGGTTCCGGAATTGGCACCTGATAAACCAGCACCTGCCTGCATGCAGCGGCGCTTCGGG
AATGCGGTGTGCGGTCTGGATCACGCTGGCTTCTTCGGTGGAAAGTCGTAGTCGCAACGCCCGCGGTCTTGGCGAAGAATTGC

GGATGGAGATGGCATTGGTAGTGTCTCCGAACCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly24|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACGTAGCGCGCATTACCTTACCAGGATAGGCGTAGGAGGTCCGCGATATG
GCCAAAGCGCGCAATGTCTCTGTACAGCTTGACGTGCATCAGGCCGTATTCGGCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCCAGGAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCCGCATGGAGCGGCGCCTCGGG
AATCCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTGGCGTCCGCCGTAGCCGTGCTCGTTGCGACGCCGGCCGTCTTGCCGAAGAATTTT
GGATCGAGATCGCATTGGTGGTATCGTCCGAACCTTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>NM+Gly25|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAACTTCGGCGTCGGTGACGGGTCCATCACATAGCGCGGTTACCTTGACCGGATAGGCAAAGGAAGTCGWGATGTG
GCCGAAGCGCGCATGTCTCTGTAGAGCTTGACATGCATCAGGCCGTATTCGGCGAGCGGTGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGCTCCAGGAAGCGGAGCGGTTCCGGTATCGGAACCTGATAGACCAGCACCTGCCCCGCGTGCAGCGGCGCTTCGGG
AATCCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTAGCGTCCGCGGTGAGGTGGTCTGGCAACGCCGGCGGTCTTGCCGAGGAATTTG
CGGATCGAAATCGCATTGGTAGTGTCTCGGAGCCCTGATCGATTACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGC
GGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGT
CGTACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG
CGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>NM+Gly26|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTCGGAT
TGTCGAATTTCCGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACGTAGCGCGGTTACCTTACCAGGATAGGCGTAGGCAGTGGCGATGTG
GCCAAAGCGGGCGATGTCTCTGTAGAGCTTACATGCATCAGGCCGTATTCGGCCAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCT
CGCGCGGTTTCGAGGAAACCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGGTTCCGCTGCAGCGACGTCTCCGG
GATGCGGTGACGCGTCTGGATCACGGTTGCATCTTCTGTTGCCGTGGTCTGGCGACGCCCGCGGTCTTGCCGAAGAATTTGC
GGATCGAGATCGCATTCTGTCGTGTCGGAACCTTGATCGATCACTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC

>NM+Gly30|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTGATCGA
CCAGGGGGCGGACGACACGACCAACGCCGTCTCCATCCGCGCGTTCCTCCAGAAGGTCGCCAATGTTGCGGTGACGACGCGT
ACGGGGCAAGCGACGAACATCCAGACGCGCCACAGGATACCGGAGCAAAAGCTCGCGGCCAATCAGGTGCTGGTCTACCAG
GTGCCGACGCCGAGCCGCTGCGCTTCCTCGAACC GCGCGAGACGGAGACCAGAAAGATGCACGCGCTTGAGGAATACGGC
CTCATGCATGTGAAGCTCTACGAGGACATCGCGCGCAACGGCCATATCGCCACGACCTATGATTATCCGGTCAAGGTGCAGG
GCCGTTACGTGATGGATCCGTCGCGACGCCGAAATTCGACAATCCAAAGATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACAC
TGCGCGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACA
ACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG
AAGAGGCCCCGACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGC
GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly33|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTTGGCGTCGCGGACGGATCCATCACATAGCGTCCGTTACCTTGACCGGATAGGCGTAGGAGGTGGCGATGTGG
CCGAAGCGGGCGATGTCTCTGACAGCTTGACATGCATCAGCCCGTATTGCGCCAGCGCATGCATGCGCCGTGTCTCGGTTTC
GCGCGGCTCGAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGGTAGACCAGCACCTGGCCTTCATGCAGCGACGCTCGGGG
ATGCGGTGCCGGTCTGGATCACGGTGGCTTCGGTGGTGTGCGTTCGTTGCGGACGCGCTGCGGTTTTGCCGAAGAATTTTCG
GATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTGCATCGGAGCCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGAAGTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly34|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATTTTCGGAT
TGTCGAATTTTCGGCGTCGCGGAAGGGTCGCTCACGTATCTGGCGTTCACCTCCACCGGATAGGCGTAAGTGGTGGCGATGTGG
CCGTGGCGGGCAATGTCTTCATACAGTTTGACATGCATCAGCCGTAATCGGCCAGTGCCTGCAATTTGCCGGGTTTCGCTTC
GCGCGGCTCGAGAAAGCGCAGCGGCTCCGGAATCGGAACCTGGTAGACCAGGACTTGATGCTCGCCGAGCGGCGTCTCGGGA
ATCCGGTGGCGCTTGATCACCGTCGCTCGGCGGTGCGCGTGGTGGTGCGAACGCCCGCGGCTTTGGCAAAAAACTTGC
GGATCGACACCGGTTGGTGGTGTGTCGTCGGAGCCCTGGTCTATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGC

>NM+Gly35|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGGTGATCGA
CCAGAGCTCCGACGACACCACCAACGCGATCTCGATCCGAAATTTCTCGGCAAGACGGCGGGCGTTGCCAGCACGACCTCG
ACCGCGAGGCGACCGTCATTCAAACCCGGCACCGCATTCCCGAGGCGACGCTGCACGAAGGCCAGGTGCTGGTCTATCAGG
TGCCGATTCCGAGCCGCTGCGCTTCCTGGAGCCCCGCGAGACCGAAACGCGGCGCATGCATGCGCTGGCCGAATATGGCC
TGATGCATGTCAAGCTCTACGAGGACATCGCGCGGTTCCGGCATATTGCGACGCTTACGCTTATCCCGTGAAGGTGAATGCA

CGTTACGTGATGGATCCCTCACCAACGCCGAAATTCGACAATCCGAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

>NM+Gly36|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGCTCGGCGACGGGTCCATCACATAGCGTGCCTTACCTTACC GGATAAGCATAACGACGTCGCGATATGG
CCGAAGCGGGCGATGTCTCTGTACAGTTTGACGTGCATCAGGCCGATTCGCCGAGCGCATGCATGCGCCGCGTCTCGGTCTC
GCGCGGTTCCAGGAACCGCAGCGGCTCGGGAATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGCCCCGCATGCAGCGGTGCTTCGGGA
ATCCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTGGCATCCGCCGTCGAGGTCGTGGTTCGCGACACCGGCGGTCTTGCCGAAAAACTTCC
GGATCGAGATCGCGTTGGTGTGTCGTCGGAGCCCTGGTCGATCACTTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly38|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTCCGGTGTGCGCGACGGATCCATGACGTATCGCGCTTGACCTTACC GGGTAGGCGTACGAGGTCGCGATATGC
CCGAAGCGCGCATGTCTCTGTAGAGCTTGACGTGCATCAGGCCATATTCGCCAAGCGCGTGCATGCGCTCGTCTCGGTCTC
GCGCGGCTCAAGGAAACGCAGTGGCTCCGGGATCGGGACCTGATAGACCAGCACCTGACCGCCATGCAGCGGCGCTTCGGGA
ATGCGGTGCCGGGTCTGGATCACGGTGGCATCTTCCGTGGAGGTCGTGGTTCGCAACACCGGCGGTTTTAGCGAAGAATTTTCG
GATCGAGATCGCATTGGTGGTGTGTCGTCGGAGCCCTGGTCTATCACCTTAAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGG
CCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
CCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly39|(M13rev)

CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAAGTGATCGA
TCAGGGCTCGGACGACACGACGAACGCCGCTCTCGATTTCGCGCTTCTTCGCCAAGGTGGCGCGCGTGGCGGTAACGACGAAA
ACGCGCGAGGCCGACATCATCCAGACGCGTCATCGCATTCCAGAGACGCCGCTCGAGGAGGGCCAGATCATCGTGTTCAGG
TGCCGATCCCCGAGCCGTCGCTTTCCTCGAGCCGCGGAGACCGAGACGCGGCTCATGCACGCACTCGAGGATTATGGCTC
GATGCATGTGAAGCTCTATGAGGACATCGCACGGCATGGCCGCATGCCACGACTTACGCGTATCCGGTGC GCGTCGCCGGG
CGTATCTGATGGACCCTTCGCCACCCCAAAATTCGACAATCAAAAATGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGG
CGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAG
AGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

>NM+Gly40(M13rev)

```
CATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTCATCTTTGGAT
TGTCGAATTTTCGGCGTCGGCGACGGGTCCATCACGTAGCGGGCGTTCACCTTACCGGGTAGGCCGTAGGCCGGTGGCGATGTG
GCCGAAGCGCGGATATCCTCGTAGAGCTTGACATGCATCAGCCATATTCGCCGAGCGCGTGCATGCGGCGCGTCTCGGTCT
CGCGTGGCTCCAGGAAGCGCAGCGGCTCCGGGATCGGCACCTGATAGACCAGCACCTGGCCGCTGTGCAGTGGCGCTTCCGG
AATCCGGTGCCGTGTCTGGATCACGGTCCGCTCCGCCGTGCTGGTGGTGGTGCACACGCCAGCGGTCTGGCGAAGAATTTCC
GGATCGAGATCGCGTTGGTGGTGTCTGTCAGAGCCCTGATCGATCACCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCG
GCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACACTTAATCGCCTTGACGACACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG
```

Anhang 5: 265 Klone der Metagenombank, die mit Glyphosat als einziger P-Quelle schwaches Wachstum zeigten.

1A:H4; 1A:C6; 1A:E6; 2A:B3; 2A:D6; 2A:D10; 4A:B4; 4A:D4 4A:E4; 4A:E10; 4A:B11; 4A:D11; 5A:B4; 5A:H6; 5A:E7; 5A:H8; 5A:H11;
6A:A3; 6A:B3; 6A:H3; 6A:C5; 6A:F8; 6A:G8; 7A:G6; 7A:B10; 8A:H3; 8A:D7; 9A:C6; 9A:H6; 9A:B9; 9A:F9; 9A:A10; 9A:E10; 9A:H11;
10A:D7; 10A:E9; 11A:G2; 11A:C3; 11A:G4; 11A:D7; 11A:E8; 11A:G8; 11A:E9; 11A:D11; 12A:G1; 12A:A2; 12A:C2; 12A:G2; 12A:E5;
12A:D7; 12A:H6; 12A:D8; 13A:C8; 13A:D10; 14A:E3; 14A:E7; 14A:H7; 15A:C1; 15A:F2; 15A:G2; 15:C4; 15A:C10; 15A:E10; 15A:H10;
16A:B1; 16A:G4; 16A:G5; 16A:D8; 16A:H10; 16A:B12; 17A:G4; 17A:C5; 18A:A2; 18A:E3; 18A:H3; 18A:B4; 18A:H4; 19A:F2; 19A:B9;
19A:B10; 11A:E3; 19A:C10; 19A:G11; 20A:F1; 20A:G6; 20A:C10; 21A:A2; 21A:C4; 21A:D5; 21A:G7; 21A:B8; 21A:C8; 21A:G9;
21A:H9; 21A:E12; 22A:H1; 22A:F3; 22A:H3; 22A:B8; 22A:F10; 23A:D3; 23A:E3; 23A:E4; 23A:E5; 23A:C8; 23A:D8; 23A:H10;
23A:E11; 24A:D3; 24A:E3; 24A:F3; 24A:D4; 24A:E4; 24A:F4; 24A:F5; 24A:A6; 24A:D6; 24A:A8; 24A:E8; 24A:F8; 24A:E10; 25A:C1;
24A:G1; 25A:D6; 26A:H2; 26A:E2; 26A:G4; 26A:C6; 26A:H6; 26A:D7; 26A:H7; 26A:F8; 26A:A9; 26A:G9; 27A:D3; 27A:D5; 27A:H8;
29A:C2; 29A:E2; 29A:C10; 30A:B5; 30A:E9; 30A:D10; 30A:B11; 31A:B6; 31A:D6; 32A:D2; 32A:A3; 32AB3; 32A:H4; 32A:A5; 32A:G8;
33A:F1; 33A:B2; 33A:C4; 33A:C5; 33A:D9; 33A:G9; 33A:D11; 34A:D2; 34A:E5; 34A:E10; 34A:H10; 34A:C12; 35A:C4; 35A:D5;
35A:H5; 35A:C8; 35A:D10; 36A:C1; 36A:D4; 36A:H5; 36A:H8; 37A:F2; 37A:H3; 37A:D7; 37A:A8; 37A:D8; 37A:H8; 38A:C5; 38A:E10;
38A:G10; 38A:E11; 39A:C1; 39A:E1; 39A:D2; 39A:H3; 39A:H4; 39A:B5; 39A:D8; 39A:H8; 40A:F1; 40A:G2; 40A:F3; 40A:D5; 40A:F5;
40A:A6; 40A:C6; 40A:E6; 40A:D7; 40A:B9; 40A:F10; 41A:C4; 41A:D7; 41A:H8; 41A:H9; 41A:H10; 42A:D3; 42A:E3; 42A:D4; 42A:D6;
42A:B9; 42A:C11; 43A:E2; 43A:H2; 43A:G4; 43A:A5; 43A:D5; 43A:G12; 44A:F2; 44A:B3; 44A:E3; 44A:H5; 44A:C6; 44A:H6; 45A:F1;
45A:D2; 45A:H4; 46A:H2; 46A:H4; 46A:H7; 47A:A4; 47A:H5; 47A:H6; 47A:E11; 48A:H5; 48A:G5; 49A:F2; 49A:H2; 49A:F8; 49A:G9;
49A:E11; 50A:F6; 50A:E9; 50A:E11; 50A:G11; 51A:A3; 51A:F5; 51A:C10; 52A:C4; 52A:B5; 52A:C5; 52A:E5; 52A:B7; 52A:E7;
52A:G8; 52A:H9; 52A:E11; 53A:A4; 53A:A5; 53A:D6; 53A:H6; 53A:B8; 53A:C11; 53A:F11;