

Fotosentetik Mor Kükürt Bakterisi *Allochro-matium vinosum*'un Flagella Operonunda Bulunan FliL ve FliM Genlerinin Klonlanması

H. Benan DİNÇTÜRK *, Volkan DEMİR **

* Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, ** İstanbul Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

ÖZET

Amaç: Bu çalışma ile fotosentetik mor kükürt bakterisi *Allochro-matium vinosum*'un flagella genlerinden bazıları-nın klonlanması ve dizilerinin belirlenerek filogenetik analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: DNA izolasyonu, DNA klonlaması, bak-teri transformasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve DNA dizi analizi gibi moleküler biyoloji tekniklerinin yanı sıra Clustal W Alignment, NCBI Blast, MEGA filogene-tik yazılımı gibi biyoinformatik araçlar da kullanılmıştır.

Bulgular: Bu çalışmada *A. vinosum*'un flagellar gen küme-sinden FliL and FliM genleri klonlanmış, dizileri belirlen-miş ve bunların filogenetik analizleri yapılarak yorumlan-mıştır. FliL ve FliM genlerinin parsimoni analizlerine göre *A. vinosum* serbest azot fiksasyonu yapan *A. vinelandii*'yi içeren gamaproteobakteriler içinde gruplanmaktadır.

Sonuç: FliM ve FliL genlerinin işlevsel karakterizasyonu için mutasyon analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: FliL, FliM, *Allochro-matium vinosum*

SUMMARY

Cloning of FliL and FliM Genes of the Flagellar Operon of Photosynthetic Purple Sulfur Bacterium *Allochro-matium vinosum*

Objective: The goal of this study was to clone and sequence some of the flagellar genes of photosynthetic purple sulphur bacterium *Allochro-matium vinosum* and to perform phyloge-netic analysis.

Materials and Methods: Molecular biology techniques such as DNA isolation, restriction digestion, ligation, polymerase chain reaction (PCR), bacterial transformation and DNA sequencing as well as bioinformatic tools such as Clustal W Alignment, NCBI Blast, MEGA software were used throughout the study.

Results: In this study we reported the cloning and sequencing of FliL and FliM genes from the flagellar gene cluster of *A. vinosum* and discussed the results via parsimony analysis. According to the parsimony analysis of FliL and FliM genes, *A. vinosum* falls into gamaproteobacteria which also includes nitrogen fixing bacterium *A. vinelandii*.

Conclusion: For the functional characterization of FliL and FliM genes, mutation analysis of the related sequences are needed.

Key words: FliL, FliM, *Allochro-matium vinosum*

GİRİŞ

Bakteri flagellası, hücrenin hareketini sağlayan işlev-sel bir motor ve aynı zamanda duyu alma-cı ve prote-in taşıma aygıtı olarak da görev yapan karmaşık bir organeldir ⁽¹⁾. Bakteri flagellası "stator" (MotA ve MotB proteinleri) ve "rotor"dan oluşan bir temel kaide (MS halkası, rot ve L- ve P-halkası), flagellanın

saat yönü ya da tersi yönde dönmesini sağlayan motor-anahtar kompleksi (C-halkası), kanca, fila-ment ve bir protein taşıma aygıtından oluşur ^(2,3). Flagella proton ve sodyum motif kuvvet ile çalışır ve elektrokimyasal enerjiyi torka, yani çevirme gücüne dönüştürür. Bakteri flagellası itici kimyasal uyarı karşısında saat yönünde, çekici olan uyarılar karşısın-da ise saat yönünün tersine döner ⁽⁴⁾.

Alındığı tarih: 21.12.2010

Kabul tarihi: 25.04.2011

Yazışma adresi: H. Benan Dinçtürk, Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Esentepe, Sakarya

e-posta: bdincturk@me.com

Bakteri flagella sisteminde elliden fazla gen rol almaktadır. Ana flagellar genler bir ya da bir kaç atasal diziden çok sayıda gen duplekasyonu ile türemiş ve her bir gen farklılaşmıştır⁽⁵⁾. Pek çoğu hâlâ kayda değer gen homolojisi göstermektedir.

Allochromatium vinosum hidrojen sülfür, elementer kükürt ve tiyosülfat gibi indirgenmiş kükürt bileşiklerini okside eden fotosentetik mor bir kükürt bakterisidir⁽⁶⁾. *A. vinosum* tatlı suların hidrojen sülfür içeren ve ışığa maruz kalan bölgelerinde dar bir ekolojik zon içerisinde yaşar. Kromatium türlerinde flagella oluşumu düşük sülfür konsantrasyonunda ve düşük ışık yoğunluğunda tetiklenir. Doğal habitatında bu faktörler birbirine zıt hareket etse de, *A. vinosum* fotosentez yapmaya devam edebileceği ideal sülfür ve ışık ortamına doğru hareket edecek şekilde flagellasyonu kullanır⁽⁷⁾.

FliL ve FliM proteinlerinin flagellar hareketteki rolleri, ilgili genlerin mutasyon çalışmalarıyla, birçok organizmada ayrıntılı olarak incelenmiştir.

FliM, C-halkasındaki FliN ve FliG ile birlikte hücre zarının sitoplazmik tarafında bulunur^(2,8). Bu motor-anahtar kompleksi, motor işlevinden, tork üretiminden, yön değiştirmeden sorumlu olduğu kadar kancanın uzunluğunu da kontrol eder⁽⁹⁾. Bir kemotaksis proteini flagellanın dönüş yönünün belirlenmesinde duyuşal bir sinyale yanıt vererek doğrudan rol oynamaktadır. CheY, iki bileşenli bir sinyal iletim sisteminin parçasıdır. Yanıt düzenleyici CheY, CheA tarafından fosforile edildiğinde, flagellar motorun tersine döndürebilmek için, flagellar proteinler FliM, FliN ve FliG ile etkileşime geçer⁽¹⁰⁾. *Caulobacter crescentus*'ta FliM'in yokluğu flagellar yapının kaybolmasına neden olmuştur⁽¹¹⁾. *Rhodobacter sphaeroides*'deki mutasyon çalışmaları da flagellar yapının bir araya gelmesi için FliM'ye gereksinim duyulduğunu göstermiştir⁽¹²⁾.

FliL sitoplazmik zarıda bulunur ancak C-terminal ucu periplazmada konumlanmıştır. FliL bakteriler arasında protein dizileri açısından korunmamıştır. Benzerlik *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* arasında % 77 iken, *C. crescentus* ile kıyaslandığında % 23'lere kadar düşmektedir⁽¹³⁾. Temel kaide ile ilgili bir protein olarak bilinen FliL'nin işlevi tam olarak bilinmemektedir. Bir çalışmada,

S. typhimurium FliL mutantının, hareket edebilen, yön değiştirilebilen, ancak daha az miktarda flagellaya sahip ve atasal tipe kıyasla daha az hareketli olduğu; bununla birlikte, FliL geni tamamen inaktive edilen *E. coli*'de ise flagella oluşumu ve kemotaktik olarak kümelenme özelliği gözlemlendiği bildirilmiştir⁽¹⁴⁾. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışma ise *Salmonella enterica* FliL mutanlarının sürü halinde hareket edebilme konusunda tamamen özürü olduklarını ortaya koymuştur⁽¹³⁾. *C. crescentus* FliL mutasyonunda flagella oluşabilmiş fakat hücreler hareket edememiştir⁽¹¹⁾. *Proteus mirabilis* FliL mutantları da hareketsizdir. FliL'nin, ortam yoğunluğundan dolayı motor durduğunda, temel kaideye ve motor bileşenlerine uygulanan çevirme gücünü hissettiği şeklinde bir hipotez ortaya konulmuştur⁽¹⁵⁾. FliL'nin rotu, artan burulma kuvvetine karşı güçlendirdiği düşünülebilir⁽¹³⁾. Bu nedenle, yüzey sinyal iletiminde bir rolü olabilir⁽¹⁶⁾.

Bu çalışmada *A. vinosum*'un flagellar operonundaki FliL ve FliM gen dizilerini ve parsimoni analizini sunuyoruz.

GEREÇ ve YÖNTEM

Restriksiyon enzimleri, T4 DNA ligaz ve pTZ57R Fermentas'dan satın alınmıştır. Genomik DNA "Qiagen Blood and Cell Culture DNA Kit" kullanılarak izole edilmiştir. Standart moleküler biyoloji teknikleri kullanılmıştır⁽¹⁷⁾. Ligasyon karışımı, tüm gece boyunca 16°C'de PCR cihazında inkübe edilmiş, daha sonra T4 DNA ligaz 65°C'de 10 dakika inkübe edilerek inaktif hale edilmiştir. DNA dizi analizi "Applied Biosystems PRISM 3100 (Avant) Genetic Analyzer" sisteminde gerçekleştirilmiştir.

Yedi yüz elli dört baz çiftlik (bç) klon, *A. vinosum*'un genomik DNA'sı kullanılarak PZT ile çoğaltıldı. PZT tek primer, R116 (5'-GACGGCG ACGCCGTGCCG-3'), çift yönlü kullanılarak gerçekleştirildi. PZT koşulları, 96°C'de 5 dakikalık başlangıcın ardından 35 döngülük, 96°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika ve 72°C'de 2.5 dakika şeklindeydi. PZT'yi tamamlamak için ise 72°C'de 10 dakikalık bir uzatma basamağı uygulandı. Ligasyon 4°C'de bir gece boyunca gerçekleştirildi. Daha sonra çoğaltılmış ürün pTZ57R vektörüne klonlan-

1 - GTCGGCGACGCCGATGCCGCCCGAGTTTGCTCCGCTCGTCTATCACAAAGCTCGATGGCTT - 60
- M P P E F A P L V Y H K L D G L

61 - GACCGTCAACCTCTCGCCAGGGGCGCCAGTGGTTCCTGCGCGTCACGCTGACCATCAC - 120
- T V N L S P G A P V R F L R V T L T I T

121 - CACGCCGAACCAGGCCGTGATCACGGCCGTGGACAAGCACATGCCCATGCTGCGCAACGA - 180
- T P N Q A V I T A V D K H M P M L R N D

181 - CATCCTGTGCTGCTGGCCGCTCAGGAATACGCCGCGCTCAACACGCCCCGAGGGCAAGGA - 240
- I L S L L A A Q E Y A A L N T P E G K D

241 - CACGTTACGGAATCCTTGCGCCAGACCCTGGTGGCGCTGCTGGTCCAGTGCTAGCGAAC - 300
- T L R E S L R Q T L V R L L V Q C *

301 - CATCGGATATTCGTGACGTGCTCTCAACGAAGTATCATGCAGTAGCAGGGCAAGCGAT - 360
- M

361 - GGCGCAGCAATCCGACATCCTCAGCCAAGGCGAGATCGACGCCCTGCTACATGGCGTCGA - 420
- A Q Q S D I L S Q G E I D A L L H G V D

421 - TAGCGGCGACGTCGATACCGACTCCAATCCCTTTCCACGGATGGTCAGGCGCGTCCCTA - 480
- S G D V D T D S N P F P T D G Q A R P Y

481 - TGACTTCGCGACCCAGGACCGCATCGTTCGCGGCCGGATGCCGACGCTCGACATGATCAA - 540
- D F A T Q D R I V R G R M P T L D M I N

541 - CGAGCGTTTCGCACGCTATCTGCGCGTGCATCTGTTCAATCTGCTGCGCCGCTCATCCGA - 600
- E R F A R Y L R V H L F N L L R R S S E

601 - GATCTCGGTCATCGGTGCGCGTGTACCAAGTTCTCGGAGTATCGGCATTCGCTCTATGT - 660
- I S V I G A R V T K F S E Y R H S L Y V

661 - GCCGACCAGTCTGAATCTGGTGCGCGTCTATCCGCTGCACGGCATCGGCGTCGCCGGC - 718
- P T S L N L V R V Y P L H G I G V A G

Şekil 1. *Allochromatium vinosum*'daki FliL ve 5' FliM benzeri genlerin nükleotid ve türetilmiş amino-asit dizileri. Bitiş kodonu yıldız ile belirtilmiştir. Genler için potansiyel "Shine-Dalgarno" bölgelerinin altları çizilmiştir.

dı ve ardından M13 ve T7 primerleri kullanılarak dizi analizi yapıldı ve klon pAVFliLM olarak adlandırıldı. *A. vinosum* fliL ve fliM genleri veritabanında GU166436 erişim numarasıyla depolandı.

Karşılaştırma analizinde kullanılan FliL protein dizilerinin erişim numaraları şunlardır: *Escherichia coli* AAC75011, *Salmonella typhimurium* NP_460928, *Azotobacter vinelandii* EAM08171, *Rhodobacter sphaeroides* AAD00576, *Pseudomonas aeruginosa* AAG04831, *Agrobacterium tumefaciens* AAB71795,

Bacillus subtilis P23452, *Aquifex aeolicus* O67712, *Heliobacter pylorii* NP_207602.

FliM protein dizilerinin erişim numaraları ise şöyledir: *Escherichia coli* AAN80821, *Salmonella typhimurium* AAA27104, *Azotobacter vinelandii* EAM08170, *Rhodobacter sphaeroides* YP353135, *Pseudomonas aeruginosa* AAG04832, *Agrobacterium tumefaciens* AAC45322, *Bacillus subtilis* P23453, *Aquifex aeolicus* AAC07248, *Heliobacter pylorii* NP_207821.

(a)

E. coli ----VAADDKAQQRVVPS-----PVFYALDTFTVNLG---DADRVLYIGITLRLK
A. vinelandii AHAGADSDAEAAAELPA-----PIFVPI SPFTVNLRGEQREERLLYVGLSLOVT
A. vinosum -----MPPEFAP-----LVYHKLDGLTVNLSPG-APVRFRLVTLTITTP
R. sphaeroides PEADEPAADPDAPQKVP RP TPERESFVTSYYQFKEPLTTNLR---ASRRLQAGIGLSTQ
B. subtilis GKSEKSEAKKSIDIVAS-----SVDVEEITTNLK----SDNIIRLAIKLETD
. : * . ** . . . : :

E. coli -DEATRSRLSEYLPEVRSRLLLLFSRQDAAVLATEEGKKNLIAEIKTTLSTPLVAGQPKQ
A. vinelandii -DKASEEFLKRYMPQLRSRLLKLF TAQTAAELMTPNGKDQLSAKILEMLOQPMATPQPTL
A. vinosum -NQAVITAVDKHMPMLRNDILSLLAAQFYAALNTPEGKDTLRESLRQTLVRLLVQC----
R. sphaeroides YDQKVMNDVARNEVALRSMDLAI VGT FSEEELQDKAGRDL-AELRGAVNARLQOLEGFG
B. subtilis -SDKSKEELEKRDFQVKDAVISLLADTNADQIEGDKGKETFKKELKDKINSYLOEGK---
. . : . : : . : : . : * : . : . : : :

(b)

E. coli --MGDSILSQAEIDALLNGD-SEVKDEPTASVSG-ESDIRPYDPNTQRRVVRERLQALEI
A. vinelandii -MAQDDLLSQEEIDALLKGV-SGEEDSSPSEPAD-TQIRIPYNPATQHRVIRERLHALDI
A. vinosum MAQQSDILSQGEIDALLHGVDSDVDTDSNPFPT-DGQARPYDFATQDRIVRGRMPTLDM
B. subtilis --MSGEVLSQNEIDALLSAISTGEMDAEELKKEEKEKKVKVYDFKRALRFSKDQIRSLTR
R. sphaeroides MAATPRKLSKKEVAALVGNL---MEASESTS-LENGLEVRPYAFGENELNQLGDYHALRI
* * . * : * * : : * : * : *

E. coli INERFARHFMRGLFNLLRRSPDITVGAI RIQPYHEFARNLPVPTNLNLIHLKPLRG TGLV
A. vinelandii INERFARYFRMSLFNLI RRSADITVDSVRYQSYSDFARNVPVPTNINLLAMKPLRG TALV
A. vinosum INERFARYLRVHLFNLLRRSSEISVIGARVTKFSEYRHS LYVPTSLNLRVRYPLHGIGVA
B. subtilis IHDNFARLLTTHFSAQLRTYIHISVSSVDQVPYEEFIRSIPNMTILNLFVDPHMEGRIMM
R. sphaeroides INERFCRTARDVFLPMLRLQPRISSFPPEVRSFDDYRSSQDNFV SITASRIEELRGNQMI
* : : * . * : * : * : : . . : : * :

Şekil 2. Çeşitli bakteri türlerinin FliL ve FliM genlerinden türetilmiş amino-asit dizilerinin Clustal W ile dizi benzerlik analizi (19). Dizilerin erişim numaraları gereç ve yöntemde belirtilmiştir. Yıldızlar özdeşliği belirtirken, çift noktalar ve noktalar yüksek benzerliği belirtmektedir. (a) FliL and (b) FliM.

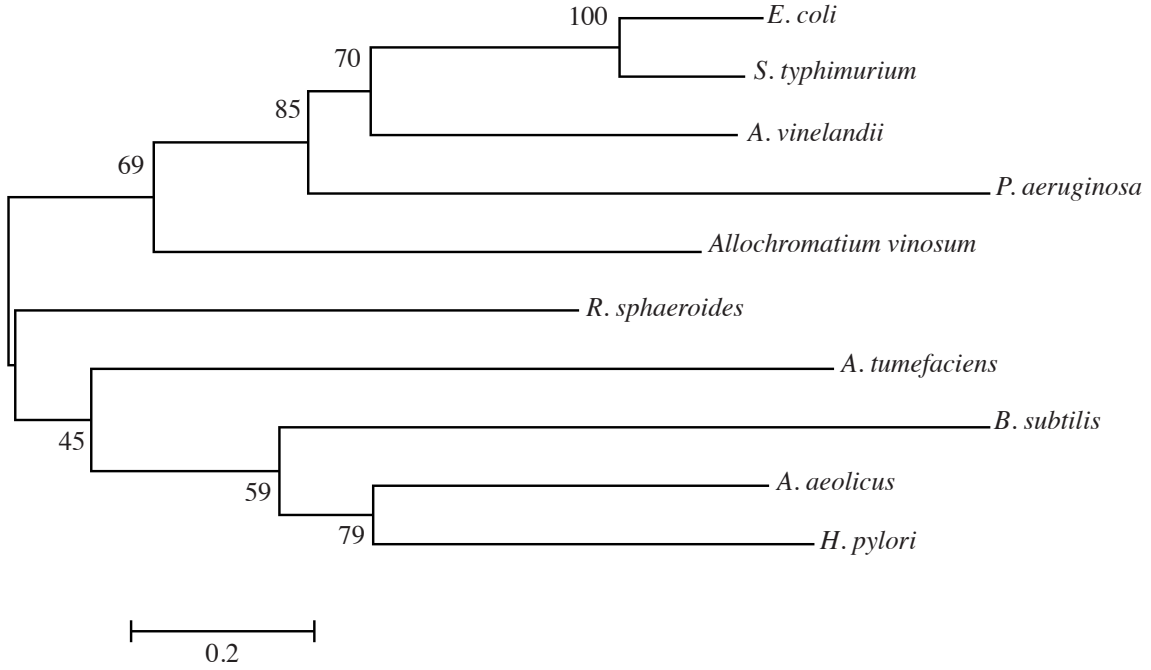
BULGULAR ve TARTIŞMA

FliL genine ve FliM geninin 5' ucuna homoloji gösteren 754 bç'lik parça klonlandı (Şekil 1). FliM dizisi, metiyoninin ön bölgesindeki nükleotitlerin zengin GA-içeriğinden dolayı bir "Shine-Dalgarno" dizisi olabileceği için protein kodlayan tam bir dizi olabilir. Ancak, bu dizi, diğer birçok türde korunmuş olan FliL proteininin beklenen boyundan daha kısadır.

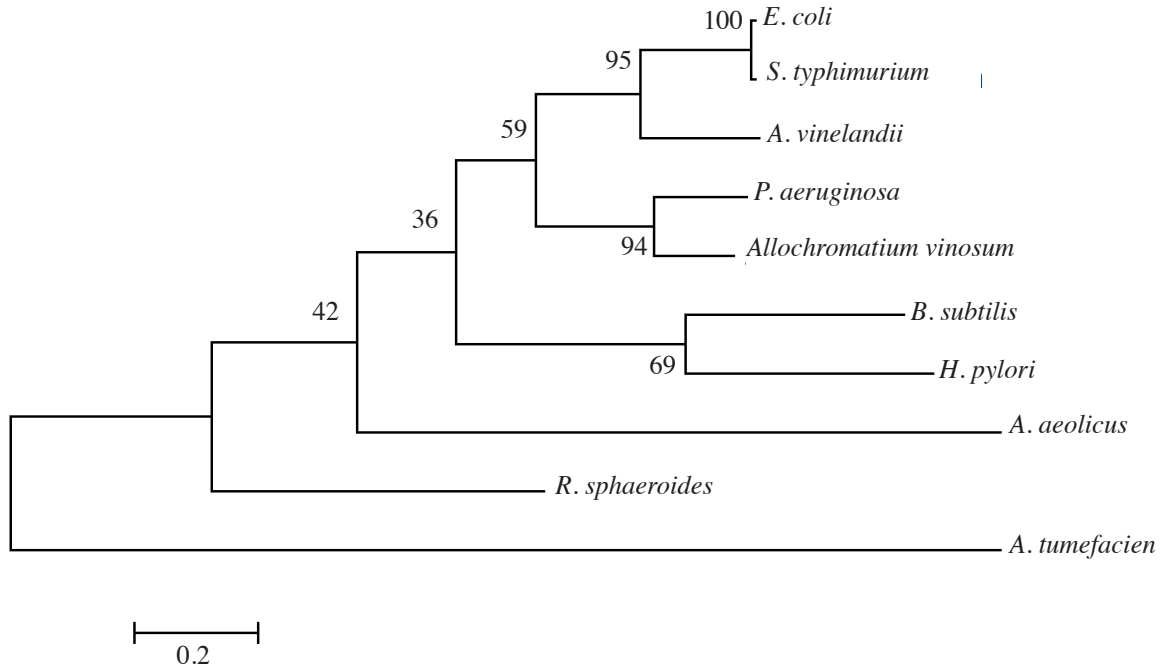
Bitiş kodonu olmadığından, elde edilen klonda FliM geni tam değildir. Bununla birlikte diğer türlerdeki ortalama 324 amino aside karşılık, bizim klonumuz FliM geninin yaklaşık % 46'sını temsil etmektedir.

İki gen arasındaki genler arası bölge 64 baz çiftidir. FliM için potansiyel bir "Shine-Dalgarno" bölgesi olarak GA'ca zengin bir bölge de gösterilmiştir. Translasyonu yapılmış bu diziler diğer bakteriyel FliL ve FliM proteinlerine sırasıyla % 67 ve % 91 benzerlik göstermektedir. Türler arasında daha az korunduğu için, FliL'nin düşük düzeyde benzerlik göstermesi şaşırtıcı değildir. Bu durum dizi benzerlik analizlerinde de açıkça gözlenebilir (Şekil 2a ve 2b). FliL geninin parsimoni analizlerine göre *A. vinosum* serbest azot fiksasyonu yapan *A. vinelandii*'yi içeren gamaproteobakteri içinde gruplanırken, *B. subtilis*, *Heliobacter pylori*, termofilik mikroaerofilik kemolitotrof *Aquifex aeolicus* ve simbiyotik azot fiksasyon

(a)



(b)



Şekil 3. Filogenetik ağaçlar *Allochroamtium vinosum* (a) FliL (b) FliM'nin genlerinden türetilmiş amino-asit dizileri kullanılarak inşa edilmiştir. Ağaç, MEGA 4 ve Saitou ve Nei'nin Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak çizilmiştir ^(20,21). Rakamlar seç-bağla ("bootstrap") değerlerini yüzde olarak temsil eder ⁽¹⁸⁾. Aşağıdaki çubuk, gösterilen dal uzunluğundaki amino-asit değişimlerinin sayısını temsil eder. Dizilerin erişim numaraları gereç ve yöntemde belirtilmiştir.

bakterisi *A. tumefaciens* ayrı bir klad oluştururlar⁽¹⁸⁾. Fotosentetik kükürt oluşturmeyen mor bakteri *R. sphaeroides* bu analiz içinde bir dış-grup olarak kabul edilebilir (Şekil 3a). FliM'nin parsimoni analizleri de benzerdir. Bu örnekte *A. tumefaciens* daha uzak bir dış-grup olarak gözlenmiştir (Şekil 3b).

İşlevsel karakterizasyon ve flagella genlerinin bireysel rollerinin saptanması için mutasyon analizlerinin yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Macnab RM.** The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J Bacteriol* 1999; 181:7149-53. PMID:10572114 PMCID:103673
2. **Brown PN, Hill CP, Blair DF.** Crystal structure of the middle and C-terminal domains of the flagellar rotor protein FliG. *EMBO J* 2002; 21:3225-34. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdf332> PMID:12093724 PMCID:126082
3. **Minamino T, Macnab R.** Components of the *Salmonella flagellar* export apparatus and classification of the export substrates. *J Bacteriol* 1999; 181:1388-94. PMID:10049367 PMCID:93525
4. **Pallen JP, Matzke NJ.** From the origin of species to the origin of bacterial flagella. *Nature Rev Microbiol* 2006; 4:784-90. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1493> PMID:16953248
5. **Liu R, Ochman H.** Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *Proc Acad Sci USA* 2007; 104:7116-21. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0700266104> PMID:17438286 PMCID:1852327
6. **Pfennig N, Truper H.** The family chromatiaecae. In: Clayton, RK, Systrom, WR, eds. Prokaryotes. 6th ed. New York: Plenum Pub Company, 1978.
7. **Overmann J, Garcia-Pichel F.** The phototrophic way of life. In: Dworkin M, Falkow S, eds. The prokaryotes, ecophysiology and biochemistry. 3rd ed. New York: Springer, 2006:32-85.
8. **Eisenbach M, Caplan S.** Bacterial chemotaxis: unsolved mystery of flagellar switch. *Current Biol* 1998; 8:444-6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70288-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70288-X)
9. **Konishi M, Kanbe M, McMurray JL, Aizawa S-I.** Flagellar formation in C-ring-defective mutants by overproduction of FliI, the ATPase specific for flagellar type III secretion. *J Bacteriol* 2009; 191:6186-91. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00601-09> PMID:19648242 PMCID:2747906
10. **Dyer CM, Vartanian AS, Zhou H, Dahlquist FW.** A molecular mechanism of bacterial flagellar motor switching. *J Mol Biol* 2009; 388:71-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.004> PMID:19358329 PMCID:3327947
11. **Yu J, Shapiro L.** Early *Caulobacter crescentus* genes fliL and fliM are required for flagellar gene expression and normal cell division. *J Bacteriol* 1992; 174:3327-38. PMID:1315735 PMCID:206002
12. **Garcia N, Campos A, Osorio A, et al.** The flagellar switch genes fliM and fliN of *Rhodobacter sphaeroides* are contained in a large flagellar cluster. *J Bacteriol* 1998; 180:3978-82. PMID:9683497 PMCID:107384
13. **Attmannspacher U, Scharf BE, Harshey RM.** FliI is essential for swarming: motor rotation in absence of FliI fractures the flagellar rod in swarmer cells of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 2008; 68:328-41. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06170.x> PMID:18284590
14. **Raha M, Sockett H, Macnab RM.** Characterization of the fliL gene in the flagellar regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1994; 176:2308-11. PMID:8157599 PMCID:205353
15. **Belas R, Suvanasthi R.** The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *J Bacteriol* 2005; 187:6789-803. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.19.6789-6803.2005> PMID:16166542 PMCID:1251568
16. **Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, et al.** Living on surface: swarming and biofilm formation. *Cell* 2008; 16:496-506.
17. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
18. **Başbüyük H, Çıplak B.** Filogenetik sistematik: terimleri, prensipleri ve çalışma tekniği üzerine kısa bir derleme. *Türk Zool Derg* 1997; 21:241-57.
19. **Higgins D, Thompson J, Gibson T, Clustal W.** Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:4673-80. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673> PMID:7984417 PMCID:308517
20. **Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol and Evol* 2007; 24:1596-99. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092> PMID:17488738
21. **Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol and Evol* 1987; 4:406-25. PMID:3447015