

---

# Genetische basis van PepMV: test voor virusagressiviteit en stabiele zwakke stam



**Auteur(s):**  
René van der Vlugt<sup>1</sup>  
Henry van Raaij<sup>1</sup>  
Petra van Bekkum<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Plant Research International, Wageningen

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR  
Business Unit Biointeracties en Plantgezondheid  
Maart 2014

---

© 2012 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Plant Research International, Businessunit Biointeracties en Plantgezondheid.

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.



Dit onderzoek is mogelijk gemaakt door financiering door het Productschap Tuinbouw  
Projectnummer 2009-083

## **Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR Business Unit Biointeracties en Plantgezondheid**

Adres : Postbus 16 Wageningen  
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen  
Tel. : 0317 – 48 06 75  
Fax : 0317 – 41 80 94  
E-mail : [info.pri@wur.nl](mailto:info.pri@wur.nl)  
Internet : [www.pri.wur.nl](http://www.pri.wur.nl)

# Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting en conclusies	1
1. Inleiding	2
1.1 Aanleiding van het onderzoek	2
1.2 Doel van het onderzoek	2
1.3 Opzet van het onderzoek	3
1.3.1 Fase A: vaststellen van de sterke en zwakke eigenschappen van PepMV	3
1.3.2 Fase B: ontwikkeling van de test	4
1.3.3 Fase C: selectie betrouwbare zwakke stam en kwaliteitscontrole	4
2. Materiaal en Methoden	6
2.1 RT-PCR en cDNA synthese	6
2.2 Klonering full-length PepMV PCR fragment	6
2.3 Maken van infectieus PepMV RNA	7
2.4 Inoculatie van planten	8
3. Resultaten	9
3.1 Fase A1: vaststellen sterke en zwakke determinanten van PepMV	9
3.1.1 Virus isolaten	9
3.1.2 RT-PCR van PepMV	9
3.1.3 Constructie van de infectieuze PepMV klonen	10
3.1.4 Controle van de recombinante plasmiden	10
3.1.5 Productie van infectieus PepMV	11
3.1.6 Inoculatie van planten	11
3.1.7 Infectie van planten	11
3.1.8 Een nieuwe RT-PCR primer	12
3.1.9 Nieuwe RT-PCR reacties	12
3.1.10 Controle van de nieuwe recombinante plasmiden	12
3.1.11 Productie RNA van nieuwe constructen en inoculatie van planten	13
3.1.12 Toetsing op infectie	13
3.1.13 Analyse van aanvullende PepMV isolaten	14
3.1.14 Infectieproeven met aanvullende PepMV isolaten	14
3.1.15 Mogelijke alternatieve systemen	15
3.2 Fase A2: uitwisselen van genetische informatie tussen kunstmatige varianten	16
3.3 Fase A3: bepalen relatie tussen genetische en biologische eigenschappen	17
4. Bespreking van de resultaten	19
4.1 Fase A1: vaststellen sterke en zwakke determinanten van PepMV	19
4.2 Fase A2: relatie tussen genetische en biologische eigenschappen	19
4.3 Fase A3: bepalen relatie genetische en biologische eigenschappen	20
5. Algemene conclusies	21
6. Bijlage I. Sequenties WUR11 en WUR48	22



# Samenvatting en conclusies

Dit verslag beschrijft de resultaten van het onderzoek dat Plant Research International in 2009 – 2012 in opdracht van het Productschap Tuinbouw (PT) heeft verricht naar de mogelijkheden om de determinant(en) van zwakke of heftige symptomen van pepinomozaïekvirus (PepMV) op tomaten te bepalen. De hiervoor gekozen aanpak was via 'infectieus virus'. In deze aanpak wordt vanaf een kopie van het RNA (het genetisch materiaal) van een bepaald isolaat, RNA gemaakt wat gebruikt wordt om planten mee te infecteren. Door veranderingen in de kopie van het RNA aan te brengen of door het (steeds gedetailleerder) uitwisselen van bepaalde gebieden tussen verschillende isolaten van het virus, kan dan het effect hiervan op de symptomen in planten worden bepaald.

In dit project bleek het wel mogelijk om via deze techniek infectieus virus te maken maar niet op routinematige wijze. Soms lukte het wel, soms niet. De oorzaak voor de onvoorspelbaarheid is niet gevonden, technische fouten konden niet worden gevonden. In principe is er dus wel een systeem om veranderingen aan te brengen in het genetisch materiaal van PepMV maar niet om die dan ook betrouwbaar op planten te toetsen. Om deze reden kon de einddoelstelling van het project niet worden gerealiseerd.

Omdat het via experimentele weg niet mogelijk bleek om mogelijke determinanten te identificeren, is aanvullende sequentie-informatie van gekarakteriseerde PepMV isolaten verzameld. Uit vergelijkingen van de genetische informatie van verschillende PepMV isolaten is wel een gebied geïdentificeerd waarin de door ons onderzochte zwakke en agressieve isolaten van elkaar verschillen. Omdat niet van alle gebruikte isolaten heel zeker vaststond of 'echt' zwak of agressief waren, is verder onderzoek nodig om te bepalen of dit gebied inderdaad een rol kan spelen bij symptoomexpressie van PepMV.

# **1. Inleiding**

## **1.1 Aanleiding van het onderzoek**

Sinds de introductie in 1998 in Europa heeft pepinomozaïekvirus (PepMV) zich zeer snel verspreid binnen de tomatenteelt. Het virus heeft sindsdien sterke veranderingen ondergaan. In eerder door Productschap Tuinbouw gefinancierd onderzoek hebben Wageningen UR (Glastuinbouw en PRI) aangetoond dat er binnen Nederland diverse varianten van het virus voorkomen die uiteenlopende symptomen en schade kunnen veroorzaken. Door de introductie van nieuwe stammen (de Chili2 en de Peruviaanse stam) is de situatie er niet overzichtelijker op geworden. In totaal zijn er in Nederland drie stammen aanwezig (EU-tomaat, Chili2 en Peruviaanse stam) die zeer regelmatig in menginfecties in verschillende combinaties in één plant voorkomen.

Opvallend is dat PepMV infecties sterk verschillen wat betreft de symptomen die ze veroorzaken. De symptomen die door het pepinomozaïekvirus veroorzaakt worden, variëren van zeer milde bladsymptomen tot heftige bladmisvorming en necrose op bladeren of stengels. Daarnaast is er ook variatie in de vruchtsymptomen zoals wankleurigheid en pepinoprint. Deze variatie wordt deels verklaard door verschillen in rasgevoeligheid en klimaatomstandigheden, maar hangen ook sterk af van de genetische achtergrond van het virus. Onder identieke klimaatomstandigheden en op uniform plantmateriaal zijn er namelijk nog steeds grote verschillen in de agressiviteit van verschillende virusvarianten zichtbaar. Het onderzoek van 2008 heeft tevens aangetoond dat deze verschillen in agressiviteit niet gekoppeld zijn aan de stamgroep van het virus. Zowel binnen de Europese tomaten stam als binnen de Chili-2 stam komen er milde en zeer agressieve varianten voor. Het is echter nog niet bekend welke genetische verschillen hiervoor verantwoordelijk zijn en waar die dan in het genetisch materiaal van het virus liggen.

PepMV is wijd verspreid en zeer infectieus. Dit betekent dat het bijzonder lastig is of bijna onmogelijk is om een infectie te voorkomen. Wat betreft een bewuste vroege besmetting met een 'zwak' virus is in eerder onderzoek aangetoond dat de aanwezigheid van een zwakke stam een zekere mate van bescherming geeft tegen het optreden van ernstige symptomen door een tweede infectie met een agressiever PepMV isolaat, maar dat dit niet altijd het geval is. Het werkt alleen binnen dezelfde stam. V1 (Peruviaanse stam) beschermt dus niet tegen Chili-2 (die 80% van alle infecties in Nederland veroorzaakt) Voor telers zijn er een aantal mogelijkheden om bij te sturen in het geval van een pepinivirusinfectie. De noodzaak om bij te sturen en de mate waarin teeltmaatregelen of hygiënemaatregelen nodig zijn, is afhankelijk van de agressiviteit van de virusvariant. Daarnaast brengen een aantal telers bewust vroeg virus in het gewas en hebben dus baat bij de selectie van een zo zwak mogelijke stam die tegelijkertijd wel afdoende bescherming biedt. Voor al deze mogelijke beheersmaatregelen is het wel noodzakelijk om tijdig een agressieve (of een zwakke) PepMV variant te herkennen.

## **1.2 Doel van het onderzoek**

Doel van dit onderzoek was uiteindelijk om in kaart te brengen welke viruseigenschappen verantwoordelijk zijn voor symptoomontwikkeling en opbrengstderving.

Deze kennis kan worden toegepast:

1. Om een test te ontwikkelen waarmee de agressiviteit van een virus kan worden bepaald. Met zo'n test kunnen telers laten bepalen hoe agressief het virus is dat op hun bedrijf is binnengekomen. Dit geeft hun de mogelijkheid om tijdig adequate teeltmaatregelen en hygiënemaatregelen te nemen.
2. Voor de selectie van een efficiënte zwakke stam. Deze kennis wordt ook gebruikt om een zwakke stam te selecteren die zo zwak mogelijk is wat betreft blad- en vruchtsymptomen en tegelijkertijd afdoende bescherming biedt bij toepassing voor cross-protectie.
3. Voor kwaliteitscontrole op een eventuele zwakke stam. Bij de productie van een zwakke stam kan de test gebruikt worden om na te gaan of er niet ongemerkt veranderingen in het virus zijn opgetreden die tot schade kan leiden.

Uiteindelijk moet dit allemaal leiden tot het beperken van de economische schade die door het pepinomozaïekvirus veroorzaakt wordt.

## **1.3 Opzet van het onderzoek**

### **1.3.1 Fase A: vaststellen van de sterke en zwakke eigenschappen van PepMV**

Fase A bestaat uit drie delen rond het maken en testen van de kunstmatige sterke en zwakke virusvarianten, de zgn. infectieuze klonen.

- Fase A1. Constructie van de kunstmatige virusvarianten
- Fase A2. Uitwisselen genetische informatie tussen kunstmatige virusvarianten.
- Fase A3. Bepalen relatie tussen genetische en biologische eigenschappen

Een virus is een simpel opgebouwd organisme. Het bestaat alleen maar uit genetisch materiaal (meestal RNA) wat wordt beschermd door een 'jas' van eiwit (de eiwitmantel). Voor potexvirussen (de groep waartoe PepMV behoort) is bekend dat niet het hele virusdeeltje (RNA + manteleiwit) nodig is om de plant ziek te maken maar dat alleen het genetische materiaal (het RNA) al voldoende is. Je kunt daar echter niet zomaar het RNA van het virus uit een zieke plant voor gebruiken. Ten eerste omdat je dit nooit voldoende zuiver krijgt (er komt altijd teveel RNA van de plant mee), ten tweede omdat het een mengsel is van verschillende vormen van het virus RNA. In het genetisch materiaal van virussen ontstaan voortdurend kleine foutjes en veranderingen. Virussen veranderen voortdurend, dat is inherent aan hun overlevingsstrategie. De opzet van dit werk (Fase A1) is dan ook om:

1. een kopie van het genetisch materiaal van zwakke en sterke stammen van PepMV vast te leggen ('te kloneren') zodat er geen veranderingen meer op kunnen treden
2. Deze kopie te gebruiken om grote hoeveelheden virus RNA te maken
3. Met dit RNA planten te infecteren en de symptomen van het virus op de plant te beoordelen.

In het vervolg van dit onderzoek (Fases A2 en A3) is het de bedoeling om die stukken genetische informatie van PepMV te identificeren die verantwoordelijk zijn voor 'sterke' en 'zwakke' symptomen. Als je erachter bent gekomen welke gebieden verantwoordelijk zijn voor de agressiviteit van bepaalde symptomen, kun je een test maken om de agressiviteit van een virusvariant te bepalen. Ook kan deze test een hulpmiddel zijn om potentiële zwakke stammen herkennen en selecteren voor eventueel gebruik in cross-protectie. In teelten die onbedoeld besmet raken met PepMV kun je deze informatie ook gebruiken. De effecten van PepMV zijn

door het sturen van teeltomstandigheden te beïnvloeden. Met een zwakke stam zul je minder beducht hoeven zijn op schade dan met een sterke stam en kun je dus ook volstaan met mindere maatregelen. Als je op tijd weet dat een sterke stam aanwezig is, kun je ook tijdig passende maatregelen nemen door bijvoorbeeld vegetatiever te gaan telen.

### **1.3.2 Fase B: ontwikkeling van de test**

Als in fase A de specifieke genetische eigenschappen voor zowel zwakke als sterke varianten vastgesteld zijn, kan in Fase B de test ontwikkeld worden waarmee sterke en zwakke varianten van PepMV van elkaar kunnen worden onderscheiden. Deze test kan dan in de praktijk al ingezet worden om bij telers PepMV te typeren zodat zij vroegtijdig en optimaal kunnen inspelen op de PepMV variant in hun teelt.

### **1.3.3 Fase C: selectie betrouwbare zwakke stam en kwaliteitscontrole**

Als er eenmaal een betrouwbare test voor sterk en zwak virus ontwikkeld is kan die gebruikt worden om 'echte' zwakke stammen te zoeken en tijdens de productie van dat zwak virus de kwaliteit te kunnen controleren.

Een uitgebreidere beschrijving van de fases is terug te lezen in het projectvoorstel.





## 2. Materiaal en Methoden

### 2.1 RT-PCR en cDNA synthese

Volgens onderstaand recept werden totaal RNA en de diverse componenten uit de SSIII RT Platinum Taq polymerase High Fidelity Kit (Invitrogen) gemengd met primers PepMV-Ch2-T7 & PepMV-Ch2-dT

2x reactie mix	25 µl
RNA	7 µl
Forward primer PepMV-Ch2-T7	1 µl
Reverse primer PepMV-Ch2-dT	1 µl
SSIII RT Taq mix	1 µl
MQ	15 µl
	-----
Totaal	50 µl

PCR programma (PTC 200 thermocycler)

1. 30 min 55°C
2. 2 min 94°C
3. 15 sec 94°C
4. 30 sec 50°C
5. 6.5 min 68°C
6. goto 2 39x
7. 5 min 68°C
8. ∞ 10°C
9. end

Uit het reactiemengsel word 5 µl op een 0.8% agarosegel (in 0.5x TBE) gecontroleerd op de aanwezigheid van het te verwachten PCR fragment (± 6400 bp).

### 2.2 Klonering full-length PepMV PCR fragment

De klonering van volledige kopieën van de RNAs van de 4 verschillende PepMV isolaten bestaat uit verschillende stappen:

1. opzuiveren van het gewenste PCR product van de goede lengte (6400 nucleotiden)
2. kloneren in een XL-TOPO vector (InVitrogen)

Deze kit is gebaseerd op het zgn TA-klonering principe. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de eigenschap van *Taq* polymerase om extra A-nucleotiden te plakken aan het uiteinde van een PCR fragment. De TOPO-XL klonering vector is voorzien van extra T-nucleotiden zodat het PCR fragment 'blijft plakken' van de vector.

Een nieuwe RT-PCR reactie leverde voldoende product op van de correcte lengte, maar helaas nog steeds een beetje achtergrond van aspecifieke PCR-producten. De PCR-fragmenten zijn gescheiden op een 0.8% agarosegel in 1xTAE-buffer. Na kleuring van de gel in Crystal Violet volgens de handleiding van de TOPO-XL: PCR cloning kit kon het 6500 nt PCR product

uitgesneden worden. Dit fragment is vervolgens opgezuiverd volgens de procedure in de eerder genoemde handleiding.

Na opzuiveren is gecontroleerd of het fragment 'schoon' was (d.w.z. vrij was van specifieke PCR banden) en voldoende geconcentreerd was voordat het geligeerd is in de met de kit meegeleverde pCR®-XL TOPO® vector.

Na transformatie van de ligatie mix naar *E.coli* JM109 waren diverse witte kolonies zichtbaar. Analyse van deze kolonies met een kolonie PCR toonde aan dat vrijwel alle kolonies het 6500 nt insert bevatten.

Van een tiental kolonies werd overnacht een kweek ingezet waaruit plasmide DNA geïsoleerd werd met de Roche High Pure plasmide isolaten kit. Het knippen van deze recombinante plasmiden met de restrictie-enzymen SmaI en SacI of met NotI gaf aan dat zich in alle plasmiden een insert van 6500 nt bevond.

Sequentie analyse van een viertal plasmide met forward en reverse M13 primers liet zien dat in alle vier plasmiden de uiteinden van het PepMV-genoom aanwezig waren. Dit geeft aan dat in deze vier plasmiden, het insert van 6500 nt zeer waarschijnlijk een volledige kopie van PepMV is.

## 2.3 Maken van infectieus PepMV RNA

Doel van de klonering van een volledige lengte kopie van het PepMV RNA is om uiteindelijk infectieus RNA te kunnen maken waarmee een plant geïnfecteerd kan worden.

Om dit te bereiken was de forward primer die gebruikt is om de volledige lengte kopie te maken, voorzien van een zogenaamde T7 promotor. Het enzym T7-polymerase herkent deze promotor en zal het daarop volgende DNA fragment aflezen in RNA. Hiermee wordt dan in een 'reageerbuis' PepMV virus gemaakt (maar dan zonder eiwitmantel). Als dit 'infectieus' RNA vervolgens op een vatbare plant gesmeerd wordt, wordt de plant besmet met het virus.

Één van de vier correcte plasmiden werd gekozen om infectieus RNA van te maken. Hiervoor werd het plasmide opengeknipt met NotI. Na fenol-extractie en een alcoholprecipitatie om alle eiwitten te verwijderen is de volgeden RNA-transcriptie reactie ingezet (RiboMax large scale RNA production system T met Cap analog; Promega):

- 10 µl 5x transcription buffer
- 3.75 µl 100mM rUTP
- 3.75 µl 100mM rATP
- 3.75 µl 100mM rCTP
- 3.75 µl 8 mM rGTP
- 10 µl NotI geknipt plasmide DNA
- 6.25 µl steriel water
- 3.75 µl ribo m7G cap analoog
- 5 µl T7 enzym mix

Dit geheel werd voorzichtig gemengd en 4 uur bij 37°C geïncubeerd. Op dit geheel is een alcohol precipitatie uitgevoerd om de m7G cap analoog te verwijderen (deze is in principe 'giftig' voor de plant). Het RNA werd na wassen met 70% alcohol en drogen, opgelost in 600 µl steriel water.

## 2.4 Inoculatie van planten

Met elk RNA-transcript werden in totaal twee tabaksplanten (*N. occidentalis* 37B) geïnoculeerd. 100 µl RNA oplossing werd op een vooraf met carborundumpoeder bestoven blad gesmeerd. Na 10 minuten werd het blad afgespoeld met water.

Symptomen van een infectie met PepMV werden visueel beoordeeld en de aanwezigheid van PepMV werd 2 tot 3 weken na inoculatie met een snelle striptest (Lateral Flow Device = LFD) getoetst.

## 3. Resultaten

### 3.1 Fase A1: vaststellen sterke en zwakke determinanten van PepMV

#### 3.1.1 Virus isolaten

Als uitgangsmateriaal zijn verschillende PepMV isolaten gebruikt:

- US2-CSL, een zwak Ch2 isolaat
- PCH 06/104, een Ch2 isolaat wat in Belgische kasproeven heftige symptomen veroorzaakte. Dit is ook het 'agressieve' isolaat wat in de kasproeven binnen het PEPEIRA project gebruikt is.
- Pep 11, een zwak isolaat dat in eerder onderzoek (zie ook PT verslag 'Variatie tussen isolaten van het pepinomozaïekvirus') milde symptomen op tomaat gaf.
- Pep 48, een isolaat dat in eerder onderzoek (zie ook PT verslag 'Variatie tussen isolaten van het pepinomozaïekvirus') juist necrotische symptomen op tomaat gaf.

Er is voor deze isolaten gekozen omdat ze allemaal tot de Ch2 stam behoren die nu wijdverspreid is in Nederland - wat uit onderdeel 2 van het parapluplan naar voren is gekomen - en omdat van US2-CL en PCH 06/104 de volledige genetische informatie (= RNA sequentie) al bekend was (uit het PEPEIRA EU-project).

#### 3.1.2 RT-PCR van PepMV

Uit tabaksplanten geïnfecteerd met de verschillende isolaten is totaal RNA geïsoleerd m.b.v. de Qiagen Plant RNAeasy isolatie kit. Dit RNA is een mengsel van planten RNA en het virus RNA. Op basis van de genetische informatie van verschillende Ch2 isolaten werden twee primers ontworpen die gebruikt kunnen worden om een zogenaamde 'full-length' RT-PCR uit te voeren. In zo'n reactie wordt in een RT-PCR een grote hoeveelheid van complete DNA kopieën van het PepMV RNA-genoom gemaakt.

De eerste primer (3'-reverse primer PepMV-Ch2-dT) is nodig om een DNA kopie te maken van het virus RNA. Dit gebeurt in een zgn. cDNA ('copy-DNA') reactie. Hiervoor is een unieke primer ontworpen die niet alleen een stuk van de virus-sequentie bevat maar ook een extra stuk informatie (een NotI knipplaats) die later nodig is om RNA-transcripten van de juiste lengte te kunnen maken.

De tweede primer (5'-forward primer PepMV-Ch2-T7) is samen met de 3'-reverse primer nodig in de PCR-reactie waarin van de cDNA kopie van het virus RNA een grote hoeveelheid DNA-kopieën gemaakt wordt. Deze 2e primer bevat aan het 5-uiteinde een zgn. T7-promotor sequentie. Dit is een stukje extra informatie wat het mogelijk maakt om in een later stadium ook weer RNA-kopieën van het virus te kunnen maken.

Met behulp van de twee primers werd in een gecombineerde cDNA / PCR reactie een volledige lengte kopie van het PepMV genetisch materiaal gemaakt (zie voor technische uitvoering 2.1).

In eerste instantie werden voor de vier verschillende isolaten van PepMV teveel PCR producten gevonden. Het verwachte PCR product van ong. 6400 nucleotiden was wel aanwezig maar niet in voldoende concentratie en er was teveel verontreiniging met te kleine PCR-producten. Het uitzoeken van de juiste reactiecondities voor elk van de vier isolaten kostte tijd maar uiteindelijk kon van elk van de isolaten een goed PCR-product van de juiste lengte worden verkregen.

Er zijn dus uiteindelijk van de volgende vier isolaten van PepMV PCR-producten van volledige lengte verkregen:

- PepMV-US2 CSL
- PepMV-PCH06/104
- PepMV-WUR11
- PepMV-WUR48

### 3.1.3 Constructie van de infectieuze PepMV klonen

De volgende stap bestaat uit het zgn. kloneren van de PCR-producten in plasmiden. Hiermee wordt de genetische informatie van de PCR-producten vastgelegd en kan deze later in een bacterie vermenigvuldigd worden.

Van elk PepMV isolaat werd het PCR-fragment opgezuiverd uit een agarosegel en gekloneerd in een XL-TOPO plasmide (InVitrogen) volgens de instructies van de fabrikant.

### 3.1.4 Controle van de recombinante plasmiden

Voor elk van de vier PepMV isolaten werden recombinant plasmiden verkregen. Deze moeten dan gecontroleerd worden of de gewenste ingebrachte volledige PepMV sequentie (insert genoemd) ook inderdaad aanwezig is en of ze in de juiste oriëntatie zit.

Dit gebeurde op twee manieren. Eerst door met verschillende specifieke PCR primerssets te kijken of zowel de voorkant als de achterkant van de volledige PepMV sequentie in het plasmide aanwezig is. Uit deze controle bleek dat er toch een aantal plasmiden een onvolledige insert hadden. De extra PepMV sequentie was niet van volledige lengte. Omdat in deze plasmiden een deel van de genetische informatie van PepMV ontbreekt kunnen deze plasmiden dus niet dienen om een volledige kopie van PepMV te maken.

Voor elk van vier PepMV isolaten werden uiteindelijk minimaal twee correcte recombinante plasmiden geselecteerd.

De tweede controle bestaat uit het controleren van de ingebrachte virussequentie door sequentieanalyse. Hiermee kan direct worden gecontroleerd of de ingevoegde ('gekloneerde') virussequentie geen foutjes bevat en op de juiste plaats en manier in het plasmide is ingebouwd. Bij het overschrijven van het virus RNA in een DNA kopie bestaat de kans dat er 'foutjes' in de sequentie van de kopie geïntroduceerd worden door het enzym wat deze reactie uitvoert. Sommige foutjes echter kunnen er voor zorgen dat de viruskopie 'onwerkzaam' wordt. In principe kan één foute nucleotide in de volledige kopie van 6400 nucleotiden hiervoor al voldoende zijn.

Het is echter erg veel werk om van elke gekloneerd virus de volledige nucleotidensequentie te bepalen. Dit is daarom in eerste instantie alleen gedaan voor WUR48. De belangrijkste reden hiervoor is dat WUR48 door Martijn Schenk van WUR Glastuinbouw in het PT onderzoek van 2008 gekarakteriseerd is als een isolaat wat duidelijk heftige symptomen op tomaat veroorzaakt. Door het bepalen van de volledige sequentie van dit isolaat kan dan de sequentie van dit isolaat ook goed vergeleken worden met andere 'agressieve' en 'zwakke' isolaten. Hieruit kunnen dan misschien al aanwijzingen gehaald worden in welk gebied (of gebieden) van de sequentie van PepMV mogelijke betrokken zijn bij de symptomen.

Voor WUR48 werd dus de volledige ingebouwde virussequentie bepaald, voor de andere constructen alleen het begin en het eind van de sequentie. Alle constructen bleken in orde. En ook in WUR48 werden geen fouten gevonden.

In vervolgonderzoek is ook van het PepMV-WUR11 isolaat de volledige RNA-sequentie bepaald. De belangrijkste reden hiervoor was dat daarmee extra vergelijkingsmateriaal beschikbaar kwam. Deze informatie is nodig om beter te kunnen bepalen welk gebied uit het genoom van PepMV betrokken is (of een indicatie is voor) het 'agressief' of 'zwak' zijn van een isolaat.

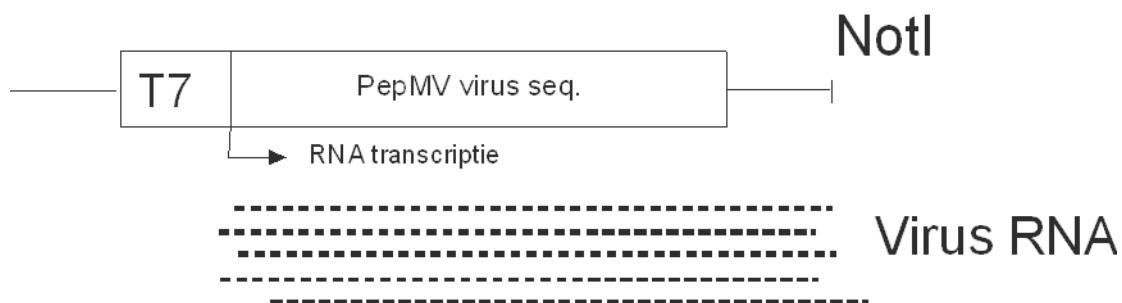
WUR11 is een isolaat van een zwakke stam (zoals in eerder onderzoek was vastgesteld). WUR48 is een isolaat van een agressieve stam met sterke symptomen. Uit de literatuur en eigen onderzoek zijn meerdere isolaten van PepMV bekend waarvan zeker (eigen onderzoek) of met redelijkheid (literatuur) vast staat of ze 'agressief' ofwel 'zwak' zijn. Door de onderlinge vergelijking van de genetische informatie van al deze isolaten kan een idee verkregen worden in welk gebied van het RNA van het virus mogelijke verschillen liggen. Deze gebieden zouden dan in het vervolgonderzoek uitgewisseld kunnen worden.

### 3.1.5 Productie van infectieus PepMV

De volgende stap in de productie van het infectieus kunstmatig PepMV bestaat uit het aflezen van de gekloneerde DNA kopie van het virus in RNA. Alleen in RNA vorm is het virus in staat om planten te infecteren.

Dit aflezen van RNA gebeurt in een zgn. transcriptie-reactie. De recombinante plasmiden bevatten elk vlak voor de PepMV sequentie een zgn. T7-promotor. Dit is een speciaal stukje DNA dat kan worden herkend door het enzym T7 DNA-polymerase. Dit enzym maakt dan vanaf een bepaalde startplaats (die precies vast moet liggen) grote hoeveelheden van het PepMV RNA. Om ervoor te zorgen dat de transcriptie ook weer stopt, wordt het plasmide DNA achter de PepMV sequentie geknipt. Hiervoor is in de eerdere RT-PCR klonering een speciale knipplaats aangebracht ('NotI'). Het T7 DNA-polymerase valt als het ware aan het eind van de PepMV sequentie van het plasmide waardoor het gemaakte RNA niet alleen een begin maar ook een einde heeft.

Voor elk van de vier constructen werd op deze manier RNA gemaakt.



*Figuur 1. Schematische voorstelling van een infectieuze kloon van PepMV. De volledige virussequentie wordt voorafgegaan door een T7-promotor. RNA transcriptie vanaf deze promotor door T7-DNA-polymerase produceert een grote hoeveelheid virus RNA. Het RNA transcript loopt van af het begin van de transcriptieplaats tot het einde van de sequentie bij de NotI knipplaats.*

### 3.1.6 Inoculatie van planten

Na het opzuiveren van het geproduceerde RNA kon dit worden gebruikt voor de inoculatie van planten. Hiervoor werden voor elk RNA-transcript twee tabaksplanten (*Nicotiana occidentalis* 37B) gebruikt omdat deze plant erg gevoelig is voor PepMV. Vanaf een week na inoculatie werden de planten dagelijks beoordeeld op symptomen. Twee en drie weken na inoculatie werden de planten getest op de mogelijke aanwezigheid van PepMV m.b.v. een RT-PCR.

### 3.1.7 Infectie van planten

Tot onze teleurstelling bleek geen van de geïnoculeerde planten uiteindelijk geïnfecteerd te worden met PepMV. Wel werd 2 weken na inoculatie in een geïnoculeerd blad een zwak positief signaal gevonden in een RT-PCR test voor PepMV. Ter controle werd dit blad fijngemalen en het sap geïnoculeerd op 37B tabak. Mocht er toch een klein beetje virus in het oorspronkelijk

geïnoculeerde blad aanwezig zijn, dan zal dit op deze manier alsnog vermeerderd worden. De uitslag van deze test was ook negatief. De conclusie hieruit was dat het oorspronkelijke positieve signaal van de RT-PCR test zeer waarschijnlijk veroorzaakt was door een restant van het transcriptie RNA wat ook na 2 weken nog op het blad zat.

Het was niet duidelijk waarom geen van de planten ziek geworden was. Uit de literatuur en contacten met andere onderzoekers bleek wel dat de kans op succesvolle infectie groter wordt als er erg veel RNA transcript gebruikt wordt voor de inoculatie. De proeven zijn daarom nog tweemaal herhaald met grotere hoeveelheden RNA. Echter ook deze inoculaties waren niet succesvol.

### 3.1.8 Een nieuwe RT-PCR primer

De kans op een infectie door een RNA-transcript wordt groter naarmate de sequentie van het transcript preciezer overeenkomt met de natuurlijke virus RNA sequentie. Dit geldt vooral voor de uiteinden (het begin en het einde van het transcript).

Het uiteinde aan de T7-promoter kant klopt precies en de eerste nucleotiden van het RNA-transcript zijn dan ook identiek aan die van het virus.

De sequentie aan het NotI-uiteinde van het transcript echter is niet hetzelfde als in het natuurlijke virus RNA. Natuurlijk PepMV RNA eindigt met een zgn. poly-A staart. Dit is een serie van A-nucleotiden die in de plant wel meer dan 100 nucleotiden lang kan zijn. Hoeveel A nucleotiden op een rijtje minimaal nodig zijn, is niet duidelijk maar hoe meer hoe beter is het algemene idee.

Bij de klonering van het PepMV RNA wordt die Poly-A start vastgelegd door de 3'-reverse primer (RT-PCR primer). Er was voor gekozen om de poly-A staart in de primer 16 nucleotiden lang te maken om de lengte van de primer enigszins redelijk te houden. Misschien waren 16 A-nucleotiden niet genoeg. Er is daarom een nieuwe 3'-reverse primer gemaakt met 25 A-nucleotiden. Ook is in deze nieuwe primer een NotI-knipplaats geplaatst direct achter de Poly-A staart om het aantal 'vreemde' nucleotiden in het RNA-transcript nog verder te minimaliseren.

### 3.1.9 Nieuwe RT-PCR reacties

Met de nieuwe 3'-reverse primer (PepMV-Ch2-dT25) en de 'oude' 5'-forward primer (PepMV-Ch2-T7) zijn nieuwe RT-PCR reacties gedaan op RNA van de vier eerder genoemde PepMV isolaten. De nieuwe noodzakelijke 3'-reverse primer gaf toch meer achtergrond banden dan de oude primer vermoedelijk omdat de nieuwe primer nog groter is dan de oude. Verdere optimalisatie van de RT-PCR om de specifieke banden kwijt te raken bleek niet mogelijk. Daarom is er een systeem uitgewerkt waarbij de full-length PCR producten apart opgezuiverd konden worden door m.b.v. een agarose gel te scheiden van de specifieke PCR-producten en ze daarna uit de gel te snijden. Na verdere opzuivering konden de fragmenten vervolgens in XL-TOPO plasmiden gekloneerd worden.

### 3.1.10 Controle van de nieuwe recombinante plasmiden

Ook de nieuwe recombinante plasmiden werden gecontroleerd op aanwezigheid en goede oriëntatie van de volledige PepMV sequentie m.b.v. PCR reacties. Voor alle zekerheid werd ook van elk plasmide de sequenties van de 3' en 5' uiteindes van de ingebouwde PepMV sequentie bepaald. Er werden geen fouten gevonden en de sequenties waren exact gelijk aan die van de gebruikte PCR primers.



### 3.1.11 Productie RNA van nieuwe constructen en inoculatie van planten

Na linearisering van de nieuwe recombinante plasmiden met NotI werden nieuwe RNA-transcriptie reacties ingezet. Met dit RNA werden weer voor elk van de vier PepMV isolaten, twee *N. occidentalis* 37B planten geïnoculeerd.

### 3.1.12 Toetsing op infectie

Twee weken na inoculatie werden de planten getoetst op infectie met PepMV. Hiervoor gebruik gemaakt van een zgn. lateral flow test (LFD). Deze test (net al een ELISA test) op de aanwezigheid van het manteleiwit van het virus. Eerder bleek al dat een RT-PCR test voor het virus een vals-positieve uitslag kan geven omdat het ook nog achtergebleven RNA-transcript kan aantonen. Manteleiwit van het virus kan alleen gemaakt worden als het virus inderdaad een infectie in de plant heeft veroorzaakt en is daarmee dus een beter bewijs voor infectie met het RNA-transcript. Uit de LFD testen bleek geen van de planten geïnfecteerd en ook na 4 weken werden er geen symptomen van infectie in de planten gezien.

Omdat in eerder testen was gebleken dat de hoeveelheid van RNA-transcript waarmee de infectie wordt uitgevoerd waarschijnlijk erg belangrijk is, werd voor construct PCH06/104 de RNA-transcriptie reactie opgeschaald. Uit kostenoverwegingen werd deze test alleen voor dit isolaat uitgevoerd. Uitgaand van veel meer DNA werd zeker 4x meer RNA gemaakt dan normaal. Na inoculatie op weer twee *N. occidentalis* 37B planten kon na ongeveer 10 dagen de eerste PepMV symptomen op de planten worden waargenomen. Na ongeveer 14 dagen werd weer m.b.v. een lateral flow test getoetst op PepMV manteleiwit en deze testen waren voor beide planten duidelijk positief zoals te zien is in figuur 2.



Figuur 2. Striptesten (LFD testen) van planten geïnoculeerd met RNA-transcripten van PepMV PCH06/104 (Ia en Ib), gezond plant sap (IIa) en water (NC). Het bovenste bandje is de controle op goede werking van de test, het onderste bandje bij Ia en Ib (T) geeft de aanwezigheid van PepMV manteleiwit aan.

De virussymptomen op de planten werden steeds duidelijker. Na ongeveer 3 weken werden de planten sterk necrotisch (zie figuur 3). Blad van deze planten werd fijngemalen en gebruikt om opnieuw *N. occidentalis* 37B planten te inoculeren. Ook deze planten werden na ongeveer 10 dagen duidelijk ziek en vertoonden dezelfde symptomen als de origineel geïnfecteerde planten.



Figuur 3. Symptomen van kunstmatig PepMV isolaat PCH06/104 op *N. occidentalis* 37B, ongeveer 3 weken na inoculatie.

Deze testen geven duidelijk aan dat het kunstmatig PepMV inderdaad infectieus is en een normale infectie kan veroorzaken. Wel is hiervoor een vrij grote hoeveelheid RNA-transcript nodig maar het maken hiervan is technisch geen probleem.

### 3.1.13 Analyse van aanvullende PepMV isolaten

Naast de hierboven genoemde isolaten is van meer PepMV isolaten het genetische materiaal vastgelegd en (gedeeltelijk) bepaald. Van deze isolaten was bekend dat ze ofwel zwakke symptomen geven ofwel sterke symptomen op planten. Deze informatie is voortgekomen uit het in 2009 voor de PT uitgevoerde onderzoek naar een nieuwe zwakke Chili-2 stam. Helaas is door het voortijdig afbreken van dit onderzoek niets bekend over evt. vruchtsymptomen van deze isolaten.

Door vergelijking van het genetisch materiaal van deze extra gekarakteriseerde isolaten met de bekende isolaten, is er beter en betrouwbaarder te zoeken naar mogelijke verschillen tussen zwakke en agressieve isolaten.

Uit de analyses kwam inderdaad een gebied naar voren waar een verschil tussen zwakke en agressieve isolaten bestaat. Dit verschil is echter maar één aminozuur. Uit het vervolg onderzoek zou moeten blijken of dit verschil in sequentie inderdaad iets kan hebben met een verschil in symptomen tussen de verschillende isolaten.

### 3.1.14 Infectieproeven met aanvullende PepMV isolaten

Hierboven is beschreven dat het weliswaar gelukt was om van vier isolaten van PepMV de volledige genetische informatie ('het genoom') te bepalen en om te zetten in 'kunstmatige virussen' maar dat pogingen om met die virussen planten te infecteren, steeds op niets uitliepen. Ter controle zijn opnieuw de kunstmatige virussen die eerder infectieus waren getoetst. Ook deze bleken niet consequent in staat om toetsplanten (opnieuw) ziek te maken. Er is veel tijd gestopt in het achterhalen van de mogelijke oorzaak (of oorzaken). Veel verschillende inoculatie-condities, controle op foutjes in de genetische informatie van de virussen, verschillende hoeveelheden kunstmatig virus. Herhaalbare inoculaties met kunstmatig PepMV bleken echter niet goed mogelijk. Alleen met isolaat PCH06/104 was het eenmalig gelukt om met behulp van een grote hoeveelheid transcriptie-RNA een aantal planten te infecteren. Om het doel van het project te bereiken (het vinden van een duidelijke 'merker' voor ernstige symptomen) is het echter noodzakelijk dat er herhaalbaar en reproduceerbaar van verschillende

constructen infectieus virus gemaakt kan worden. Dat is niet voor alle PepMV isolaten het geval. De oorzaak daarvan was en blijft onduidelijk.

### 3.1.15 Mogelijke alternatieve systemen

Om toch op een reproduceerbare manier infectieus virus te kunnen maken is gezocht naar mogelijk alternatieve systemen. Op basis van persoonlijke contacten is er contact gezocht met een Spaanse onderzoeksgroep die een wetenschappelijk artikel had gepubliceerd waarin een kunstmatig PepMV werd beschreven dat wel infectieus op planten was. De bedoeling was om m.b.v. het door de Spaanse groep ontwikkelde systeem, wat technisch op een ander systeem berust dan het door ons in dit onderzoek gekozen systeem, opnieuw te proberen om infectieus kunstmatig virus te maken op basis van Nederlandse PepMV isolaten.

De Spaanse groep wilde wel meewerken en hun systeem beschikbaar stellen voor ons onderzoek. Hiervoor moesten wel juridische documenten ondertekend worden door beide onderzoeksinstituten (zgn. 'Material Transfer Agreements'). Dit nam helaas enige maanden in beslag omdat de juridische afdelingen van PRI en het Spaanse instituut daar hun zegen aan moesten geven. Uiteindelijk is het systeem door de Spaanse groep beschikbaar gesteld. Na ontvangst is een kunstmatig virus m.b.v. het Spaanse systeem geproduceerd en dit bleek inderdaad in staat om tabaksplanten te infecteren. De genomsequentie in dit construct is echter van een Spaans PepMV Chili-2 isolaat (Sp5). Zowel omdat op het gebruik van dit Spaans construct niet vrij was van rechten en het een Spaans PepMV isolaat bevat, waarvan het niet duidelijk was of het een zwak of 'agressief' isolaat betrof, kon dit materiaal niet gebruikt worden voor verdere proeven.. Het systeem had echter wel laten zien dat het werkt en in principe mogelijk zou moeten maken om onze Nederlandse PepMV isolaten in te bouwen.

Omdat het de bedoeling van het onderzoek was om de 'agressieve eigenschappen' van eerder uitgebreid onderzochte Nederlandse isolaten vast te stellen, is gestart met het inbouwen van de genomsequenties van twee van deze PepMV isolaten. Een 'sterk' isolaat WUR48 en een 'zwak' isolaat WUR11. Van deze twee isolaten was al binnen dit onderzoek de volledige genomsequentie bepaald (zie Bijlage 1).

Hoewel het geen probleem bleek om m.b.v. het eerder ontwikkelde systeem volledige lengte kopieën te maken van deze twee isolaten, bleek het in de praktijk lastig om die in te bouwen in het Spaanse systeem. Ondanks contact met de Spaanse groep en een groot aantal pogingen lukte het niet om de genetische informatie van onze twee Nederlandse isolaten zonder fouten vast te leggen in het nieuwe systeem en daar RNA van de goede lengte mee te maken. Hiermee bleek het ook met het Spaanse systeem niet mogelijk om op een reproduceerbare manier van de twee Nederlandse isolaten infectieus virus te maken.

Inmiddels was er al diverse malen contact geweest met de Leerstoelgroep Virologie (LSG Virologie) van Wageningen Universiteit omdat deze groep ook onderzoek doet wat gebruik maakt van vergelijkbare systemen om infectieus virus te maken. In overleg heeft de LSG Virologie onze twee, eerder gemaakte infectieuze constructen van WUR48 en WUR11 meegenomen in hun systeem. Er zijn een aantal infecties met RNA-transcripten van WUR48 en WUR11 uitgevoerd. De meeste pogingen tot infectie mislukten maar uiteindelijk bleek het mogelijk om voor WUR48 toch infectieus virus te maken. In eerste instantie werd tabak (*Nicotiana benthamiana*) ziek en vanuit deze planten werd daarna zowel tomaat als een ander tabak (*Nicotiana occidentalis* P1) geïnfecteerd.

Door alle extra pogingen om toch infecties met de verschillende PepMV-constructen te krijgen was het budget voor het onderzoek vrijwel uitgeput. Omdat het niet lukte om met WUR 11 ook planten te infecteren is besloten om de focus van het onderzoek te verleggen naar het volgen

van WUR48 in planten. Omdat er uitgegaan wordt van een compleet homogeen virus, met maar één sequentie, levert het volgen van de mogelijke veranderingen die optreden in dit virus tijdens opeenvolgende infectiecycli in planten zeer waardevolle informatie over hoe snel PepMV kan veranderen. Dit is belangrijke informatie als je een zwakke stam wilt gaan gebruiken omdat je er zeker van moet zijn dat die zwakke stam ook zwak blijft.

Na een aantal infectiecycli op zowel tomaat als tabak bleek WUR48 duidelijk een 'agressief' isolaat wat vrij sterke necrose op geïnfecteerde tomaat veroorzaakt (zie Figuur 4).



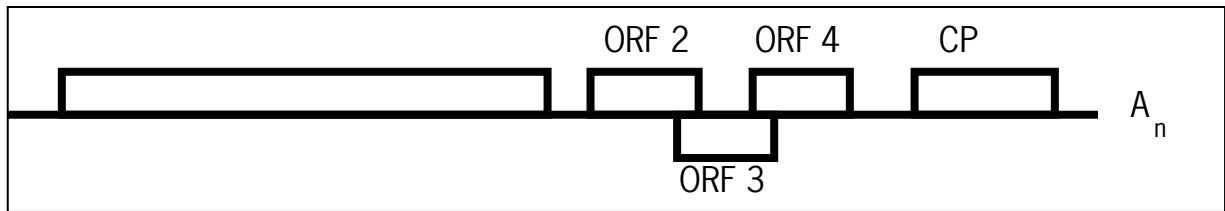
Figuur 4: Symptomen van WUR48 op tomaat en *Nicotina benthamiana*

### 3.2 Fase A2: uitwisselen van genetische informatie tussen kunstmatige varianten

Om te kunnen bepalen waar in de genetische informatie van PepMV de eigenschap (of eigenschappen) liggen die bepalen of een isolaat zwakke of juist heftige symptomen veroorzaakt, is het nodig om die informatie uit te kunnen wisselen tussen of zwakke en agressieve varianten.

In principe moet dit gaan via een proces van steeds verder verfijning waarbij eerst grote stukken uitgewisseld worden tussen twee varianten en daarna steeds kleinere stukken. Dit totdat het gebied (of gebieden) waarin de genetische informatie voor de heftigheid van de symptomen bepaald is.

Figuur 5 geeft een overzicht van de genetische informatie op het RNA van PepMV. Dit RNA bevat de informatie voor een vijftal eiwitten. Alleen van het eerste (en grootste eiwit is de functie bekend; RNA-polymerase (RNA Pol) is betrokken bij de vermeerdering van het virus RNA in de plant, het CP is het manteleiwit van het virus. ORF2, 3 en 4 coderen voor eiwitten met onbekende functie.

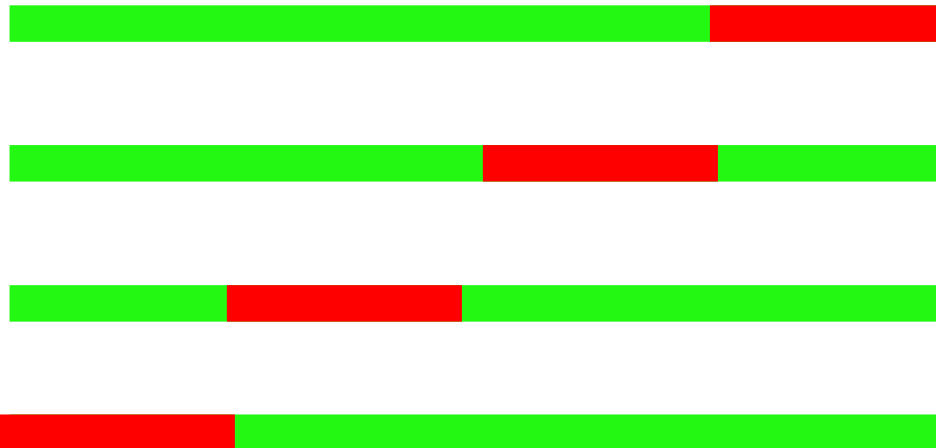


Figuur 5. Schematisch overzicht van de genetisch informatie op het RNA van PepMV



Figuur 6. Schematische weergave van het RNA van een zwakke (groen) en een agressieve (rood) variant van PepMV

In figuur 6 is schematisch een zwakke variant van het virus aangegeven met groen, een agressieve variant met rood. Uitwisselen van delen van de genetische informatie voor beide varianten leidt dan tot de voorbeelden zoals die in figuur 7 te zien zijn.



Figuur 7. Mengvormen van het RNA van zwakke en agressieve vormen van PepMV

### 3.3 Fase A3: bepalen relatie tussen genetische en biologische eigenschappen

Door het experimenteel uitwisselen van stukken genetische informatie is in principe het gebied (of gebieden) te vinden wat bepaald of een isolaat zwak of agressief is. Dit kan echter erg veel werk zijn. Een hulpmiddel hierbij is het analyseren van de genetische informatie die al PepMV isolaten beschikbaar is. Nu zijn er de laatste tijd veel PepMV sequentie in de databanken beschikbaar (o.m. uit het EU-PEPEIRA project) maar helaas is de biologische informatie over deze isolaten onbetrouwbaar of ontbreekt zelfs.

Op dit moment zijn slechts van een paar PepMV isolaten redelijk betrouwbare biologische gegevens bekend. Naast de vier PepMV isolaten die in dit onderzoek gebruikt worden zijn ook de volledige sequenties van PepMV-1066, PepMV-DB1, PepMV-BBA1137 en PepMV-PA bekend:

- PepMV-1066 is het type-isolaat van de EU-tomaten stam van PepMV en is het originele isolaat dat in 1999 in Nederland gevonden is. Het geeft zeer consequent zwakke tot zeer zwakke symptomen op tomaat.

- PepMV-BBA1137 is het type-isolaat van de Peruviaanse stam van PepMV. Voor zover bekend geeft dit isolaat zeer zwakke tot zelfs geen symptomen op tomaat.
- PepMV-DB1 (EU-tomaaten stam). Een isolaat wat zeer consequent necrose op tomaat veroorzaakt.
- PepMV-PA (Pools, Ch2). Voor zover bekend is ook dit een necrotisch isolaat maar of het in de praktijk altijd necrose veroorzaakt is niet met zekerheid bekend.

Uit de eerdere analyses van de genetische informatie van in Fase 1A bestudeerde isolaten was een gebied naar voren gekomen waarin 'zwakke' en 'agressieve' PepMV isolaten van elkaar verschillen. Omdat het hier om slechts om één aminozuur in een eiwit gaat is het nog lang niet zeker dat dit verschil ook echt verantwoordelijk is voor verschillen in symptomen. Hoe meer echter dit verschil in biologisch goed gekarakteriseerde PepMV isolaten gevonden wordt, hoe groter de kans dat dit verschil ook daadwerkelijk iets te maken heeft met het verschil in symptomen. Van andere plantenvirussen is ook bekend dat een verschil van één aminozuur in een eiwit verantwoordelijk kan zijn voor totaal andere symptomen. Daarom zijn de sequenties van dit gebied van nog andere PepMV isolaten geanalyseerd die uit het door PT-onderzoek naar mogelijke zwakke stammen van PepMV naar voren waren gekomen.

*Tabel 1: Geanalyseerde PepMV isolaten met hun stam-kwalificatie en sterkte van symptomen*

<b>PepMV isolaat</b>	<b>Stam</b>	<b>Symptomen</b>
PCH06/104	Ch2	agressief
PepMV-1066	EU-tomaat	zwak
PepMV-DB1	EU-tomaat	agressief
PepMV-PA	Ch2	agressief
PepMV-BBA1137	Peru	zwak
WUR-48	Ch2	agressief
WUR-9	EU-tomaat	zwak
WUR-11	Ch2	zwak
WUR-32	EU-tomaat + Ch2	agressief
WUR-54	Ch2	zwak
WUR-63	Peru + Ch2	agressief
WUR-64	Ch2	agressief
WUR-73	Ch2	agressief
WUR-91	Peru + Ch2	Zwak

Alle beschikbare RNA sequenties van de verschillende PepMV isolaten, inclusies van de vier in dit onderzoek gebruikte PepMV-isolaten (zie hierboven), zijn opnieuw met elkaar vergeleken m.b.v. het computerprogramma MegAlign (onderdeel van het DNASTAR pakket).

Uit deze vergelijkingen kwam weer hetzelfde gebied naar voren wat al eerder een verschil laat zien tussen necrotische isolaten en zwakke isolaten.

Helaas kunnen met de huidige stand van de techniek niet betrouwbaar genoeg infectieuze transcripten van mogelijke recombinanten van PepMV gemaakt worden. Daardoor is het niet mogelijk om te bepalen of het gevonden verschil ook verantwoordelijk is voor het verschil in symptomen.

## **4. Bespreking van de resultaten**

### **4.1 Fase A1: vaststellen sterke en zwakke determinanten van PepMV**

In Fase A1 van dit onderzoek moest worden getest of het mogelijk is om een kunstmatige variant van PepMV te maken. De genetische informatie van verschillende zwakke en agressieve varianten van PepMV kon worden bepaald en vastgelegd. Uit vergelijkingen van de genetische informatie (het RNA) van meerdere zwakke en 'agressieve' PepMV isolaten, is een gebied geïdentificeerd waarin een klein maar wel duidelijk verschil tussen deze twee groepen van isolaten bestaat.

Voor twee verschillende 'agressieve' isolaten (PCH06/104 en WUR48) is het gelukt om infectieus virus te maken waarmee planten konden worden geïnfecteerd.

Ondanks vele pogingen om ook van andere isolaten van PepMV infectieus virus te maken bleek dat niet mogelijk. De reden(en) hiervoor zijn onbekend. Alle sequentie-analyses lieten zien dat er geen fouten in de ingebouwde genomen van de isolaten zaten. Controle van de transcriptie-reacties lieten steeds grote hoeveelheden RNA van de juiste grootte zien maar infectie van planten was steeds, ook na veel herhalingen, niet succesvol. Ook waren de twee succesvolle constructen niet herhaalbaar op planten infectieus.

Navraag bij diverse buitenlandse onderzoekers die met vergelijkbaar onderzoek, ook aan PepMV, bezig waren, leerde dat ook zij grote problemen met dit virus hadden. Ook daar bleek het probleem de herhaalbaarheid van infectie te zijn.

Dit alles geeft aan dat het niet erg waarschijnlijk is dat voor PepMV met de hier gebruikte technieken, en het beschikbare budget, op routinematige wijze de benodigde infectieuze uitwisselingsconstructen gemaakt kunnen worden. Zonder betrouwbare en herhaalbare infectie-experimenten wordt het erg moeilijk om de betrokkenheid bij de heftigheid van symptomen, van bepaalde gebieden in het genoom van PepMV te bewijzen.

### **4.2 Fase A2: relatie tussen genetische en biologische eigenschappen**

Er is in dit onderzoeksproject een systeem uitgewerkt waarbij verschillende stukken van PepMV varianten kunnen worden vermeerderd in een PCR reactie. Hierbij worden in principe de recombinante plasmiden voor elk van de vier isolaten uit Fase A1 gebruikt. Deze PCR-fragmenten kunnen dan worden samengevoegd in een nieuw plasmide. Hierbij blijven de 5'- en 3'-uiteindes met de noodzakelijke T7-promotor en het NotI uiteinde intact. Dit nieuw plasmide kan dan vervolgens weer worden gebruikt om RNA van af te lezen en hiermee planten te infecteren.

Er is in Fase A2 een eerste construct gemaakt waarbij het RNA-polymerase gebied van een zwak isolaat is gecombineerd met de rest van het RNA van een agressief isolaat en omgekeerd. Deze constructen zijn gecontroleerd of er geen fouten in de genetische informatie zijn geslopen. Dit construct bleek geen fouten te bevatten.

Omdat het met de niet-recombinante constructen niet mogelijk bleek om planten herhaalbaar te infecteren en het budget aan het eind van het project niet toereikend meer was, zijn er geen pogingen gedaan om planten met deze constructen te infecteren.

## **4.3 Fase A3: bepalen relatie genetische en biologische eigenschappen**

Het is in dit project niet gelukt om herhaalbaar planten met infectieuze transcripten van de verschillende PepMV isolaten te infecteren. Daarom heeft het maken van verschillende mutanten waarbij specifieke gebieden tussen zwakke en agressieve isolaten uitgewisseld worden, ook weinig zin.

Uit de vergelijking van de genetische informatie van verschillende zwakke en agressieve isolaten van PepMV kwam wel een bepaald gebied naar voren waarin een duidelijk verschil tussen beide vormen zichtbaar was. Het is nog niet 100% zeker dat dit verschil ook verantwoordelijk is voor het verschil tussen zwak en agressief. Daarvoor zijn juist de infectieuze klonen nodig.

Aanvullende informatie kan wel worden gehaald uit de vergelijking van nog meer PepMV isolaten. Van die isolaten moet dan wel goed bepaald worden of ze daadwerkelijk zwak dan wel agressief zijn.



## **5. Algemene conclusies**

Hoewel het einddoel van het project niet gehaald is, kunnen wel een aantal algemene conclusies getrokken worden:

In principe is het mogelijk om van PepMV infectieus virus te maken. Het lukte echter niet om dit routinematig te doen. Andere onderzoeksgroepen rapporteerden vergelijkbare problemen. Daarom lijkt deze opzet om te achterhalen welke gebieden in het PepMV genoom verantwoordelijk zijn voor bepaalde symptomen niet betrouwbaar en herhaalbaar inzetbaar.

Uit vergelijkingen tussen de genetische informatie van PepMV isolaten komen wel verschillen tussen zwakke en agressieve isolaten naar voren. Er is met name een specifiek verschil in ORF4 gevonden. Voordat uit dit verschil in sequentie, of de andere verschillen, geconcludeerd kan worden dat ze ook gecorreleerd zijn met zwakke of agressieve isolaten is aanvullend onderzoek nodig. Er moet zeer goed (d.w.z. onder verschillende teeltcondities) worden vastgesteld of een bepaald isolaat zwakke dan wel sterke symptomen veroorzaakt. Er moet worden uitgesloten dat er sprake is van een menginfectie van verschillende stammen. Deze analyses moeten bij voorkeur aan een groot aantal isolaten worden gedaan. Hoe meer, hoe betrouwbaarder. Helaas is de literatuurinformatie van andere isolaten niet volledig of betrouwbaar op dit punt zodat het in feite onmogelijk is om alleen op basis van sequentievergelijkingen gebieden of zelfs bepaalde nucleotiden of aminozuren aan te wijzen die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor verschillen in symptomen.

## 6. Bijlage I. Sequenties WUR11 en WUR48

### WUR11

GAAAACAAAACATAACACATAATATCAAAAAGTGACCAAAACACAACATAACCACGTGGAAAAACAGCGAAAGCACTTTACCACAT  
TATGTCTCGTGTTAGAAACACTTTAGAAAAAGATCAGGGACCCACAAGTACAATCTAGCATTGTGAAGCCGCTTACCAACATGT  
TAGACCTGTGCTCAAGGAATCCCTAATCAACTGTCTTATGCGCTTAATGACTATGAAGCAGACACCCTTGAGAATTTAGGTGT  
CACAATAAACCCCATGCAATCCAAACACATACTCATGCGGCAGCTAAAGTTGTGGAAAATAGAATGCTCGAAATTTGTTGGACA  
CCACTTGCCCAAGGACGAGAAAGTTACCTTCATTTTCTCAAAAAGAAGCAAAGTGAATACATGCGAAGAGCTGCTGTACATA  
AAGATGTTTTTTGTTAATCACAATATAGAACCTAAGGATTTCTCAGGTATGATGAGGAATCTACATCTACTAGTTTCTCCGTGAA  
CACCAGGATCGCTTACATCTCCGATTCTCTACATTTTATGGAACCAGCTGATGTGACCCACCTCTTCGACCGTTGCCACAGTC  
TTAAAACACTGATGGCAACTGTTGTTTTACCTGTTGAAGCCATCCACAACAAACATCTTTATTTCCAGCGATATACTCCATTAA  
TTACAATGAAGAAGGTTTTGAGTATATCCCTGGTTCTCATGGTGGAGGGGCATACTTTCATAAGTATGAAACATTAGACTGGCT  
CAAATACTCTAGATTGCTTGGCCAGGACCCCTTAAGTGGACTCCGATACACCATAACCATTCAAATGGTGGAGAGTTAGGAG  
CCAACCATCTTTTCTCTTCCAAAGAGGAAATTTGAAAACCTTTATACAGGACGTTTCAAAAAATAGCTTTGTGACCTTTCC  
TAACATCTTCCATCCCAACATGTTAATGCCACAAAGCCCATGCCAAGATCCAGGGCAATTCAGCTGTATTTATATGTCAAATC  
TGTAATAAGGTGACACAAAGAGATATCTTTGCGAAAGTAAAGCAACTTATATCTACAGCAGAACTTGAATTGTATGACCCTGA  
CGAECTTACACATATTGTCAATTATTTGCGCATATGTCTCAGAACTAAGCTCAATCAACGACTATGACAAATATGCTCAAATCAAGT  
TTTTTCAAAAACTTGTGACCCATGCGACATGACTGGAGGTGCATGATTGAATCTTTTCGGGGAAAAAGTATTTCAATCAA  
CTTTTAACTACTCTTCAATGGAAAGACTTCTCTTACACCATTAAGTGAAGAGTTAGTTATTGCTACACACACTGAAATTTGGCC  
AGGCAATCTGTAAGCTGCGACCACATACAAAGAAAGAAGACAATTGACCAATTTAGTCAAACAAGGCGCAGTAACATTAGCTG  
ATTTCAAGAAGCTGACCAGCATGTGGAGTACACTCACTTTGATCCTGAGTTTAAATCCACTGTTGACCCCAACGGAGCTAT  
GAAAATGCCATCAACAATCTTGGCATTGAGATTAATGAGGATGTACCTGAAAGTTCGGCCTAATGAAACATTGCTTAAACAAT  
GAAATATCTTTAGCAATGTCTATGCTGAAACATGTGCAAGCTGTTCAAGAAATGAGTCTTTACTCTCTAACCCCGAAGCGGCA  
CCAATATTGCCCCCTGCACATGTTAAAACATGGGCTAGCCTTGCATCTGACACTTCAAGCACTAAAAACCGTGAATCGAAGA  
TATAGTGGCTAAGCTGGAAATACAAAGAAATGAAGCTAGTTGCAGCTACCTTCAACCAATAAGGAATTGTCAAACCCAAAGGC  
TGCTGATAACAATCTCCCCTGGAATGCTTGGATCCCATTGCTTAAATGCACACGGCTTCAAAGGAGATCAATTACAATACGGCC  
CAGATGGTAACTTGATACAGCCATCCAAGACATTAACAATTCACAGCCTAGATCTGACTATCCGTCTTCTCTGCCATGTAAC  
TTGTGGAAACTTTGAGGAAAATTAAGCGTGCTGTCTATGCCATCCCAATAAGCCACAGGAGGGCTAGTGCTTACAGTTCTGAC  
ATCAAAAATAACAGAACTGGCAAACTTCTCTGCAACCAAGCAAAGAAATGAAAGAAAGCTTTGCTTTCAAATGCAACATGAA  
GACATCGTCAAATCAGGTGTTGTCATACATGGTTGCGGAGGTTCTGGCAAATCCAGGCATTACAAAACCTTCTTGAGAACATT  
GGGTGATTCAAATGATTGCTGTACTGTTGTAGTACCCACTGTTGAACTTAGAAATGACTGGGTAACAAAACCTCATAAATGGCC  
CATGGAGCATATCAAAACATTGGAGAAAGCAATGATTCAACCTGRCTTTCCAATTGTTATATACGATGATTACACCAAGTTGCC  
ACCTGGCTACATTGAAGCATACTGTTTACCATGCCAACACTGAGCTTTTCACTACTGTTGATTCTAGGCAAAGCGTGTA  
CCATGAATCTAACAATGAAGCGTACATTGCCTCATTAGATGAAGCTGTGCGCATACTACGCTAATTAAGCGGTTTTACTTAAA  
TGCCACTCATAGAATGTCCGTAGTTAGCCAACAAACTTGGTGTTCACAGTGAAGAAAGAGGACACTTGAATCATTCTTTGC  
TTCACATGCCTTACAAAAGTGCAAAGTGCCAATTTAGTTCTTCTCAAATGAAAAGAGTGCTATGTTAGACATTGGACATAAA  
TCCATGACCTATGCTGGTTGCCAAGGTTAACAGCACCCAAGGTACAAATTCCTTGATAACCACACGCAACATTGCTCTGA  
CAGAGTTCTGTACACCTGTCTGTCTCGTGCAGTTGATTCCATCCACTTCAATACTGGTCCCAACAATTCAGAATTTGGGA  
TAAGCTTGAAGCAACACCATATCTCAAAGCCTTATTGATGTCTATAGAGATGAAAAACTGAAATGCTCAATTCTAAGCCTGC  
TGATGACAGTCCAAGTGAAGCCTGAAGCACCCTGTTACACATTTCCCAATAGCAAATGAAATAACTTAGAGAAATTAGCTTCTGC  
TTTGCTGAAAAATTTGCTAGGGAGATTTATGACAAGCATCATGGCCACTCCAACACAATCCAAACTGAGAACCCTGTGGTCC  
AACTTTTCCAACATCAACAAGCGAAAGACGAGACACTCTTTGGGCTACAATTGAAGCTAGATTGTCTATAACAACCTCTGAAG  
CAAACCTCAGAGAATTTTGTCTAAGAAAGATGTTGGAGACATTCTTCTTCAATTACCATAATGCGATGTGCTTGCCTGCCG  
ATCCTGTTGACTTTGAAGAAAAACCTGGGAGATCTGTGCTGCTGAAGTAAAAACACTTATCTTGCCAAACCATGGCCAATC  
TTATCAATGCGGCAAGTAGACAATCACCCGACTTTGACTCTAATAAGATCTCATTATTCCTAAAGTCTCAATGGGTGAAAAAG  
TGGAAAAACTTGGAGCTATCAAATCAAACCTGGTCAGACCATAGCTGCTTTTATGCAACAAACAGTCATGTTGTATGGTACTA  
TGGCTAGGTAAGGAAAATGCGGCAAGATTCCAGCCAAAACACATATTCATCAATTGTGAAACCACAACCTGATGATCTCA  
ATAAATTTGTCAAAGATGGCTGGAACCTTAACAGAACCGCCAAACAAATGACTTCACTGCTTTTGTATCAGTCACAAGATGGAG

CAATGCTGCAATTTGAAGTCATGAAAGCAAAATTTTTAACATTCCAGCTGATGTCATTGAAGGCTACATCAACATCAAGCTGA  
ATGCTAAAATTTCTTGGAACTCTCAATAATGAGACTTTCTGGTGAAGGTCCCACATTTGACGCTAACACTGAGTGTTGCA  
TTGCATACACTGCCACAAGATTCCATATTGACAATACTGTTAAGCAAGTGTATGCCGGTGACGACATGGCATTAGATGGAGTTG  
TGAGTAAAAAGAAATCATTGAGGAAGTTACAAAATCTACTAAAACACTCTTCAAAAACGCTGTACCCAAAACAGGTTAAAGGGG  
ATTACGCTGAATTTGTGGTTGGACTTTACACCAGGGGGTATAATTAATAATCCACTTAAAATGSATGCCCTCAATTATGCTGC  
AAGAAGCCATTGGCAATCTGCACACAGCAGCCAGATCTTATGCAATTGACATGAAGCATTACACAAATGGGTGACCAACTG  
CATGACTACCTAACCCCGATGAAGCTGAACAACATTTCTAGCCTGTGAGAAAAGCTTACAAAACCTCATCAAGGCGAGGCCA  
TGCGTCTTGGGGAGAAAAGTCCACCAAGATCAACCCATTAAGGGGTTAAGTTTGCCCCAGATTTGAAATGGAAAAGATCAACTT  
TGATCAATWTACTTCTGTTACACAATTTGAACACAAGATTAACACTGAAGGAATCATTGTTGTGCACGGAATTGCTGGAAGT  
GAAAACACATTGCTTAGGACTTTATTTCTGCATACCCTAGCTTAGTTATAGGTTACCTAGGCCCTGTTACTTAGATAAAG  
CTAATAAAAATTTACAAGTTTGCCTTTCTGTTTTCCAAATACCTTGTGTGACATTGTTGACGAGTACCATCTCTTAGAAAATTT  
TCCTGAACCAAACTAGCCATTTTGGTGACCCCTGTCAGTGCATTACATTGAAAGGTTGAGAACACCAACTACACATCCTT  
CAGAACACACCGATTTGGCAAATCCACTGCTGCTCTACTAAACAAGTTATTTGATCTTAACATTGAGTCTGTCAAAGCACAAGA  
CGACACAGTAGAATACTTTGATCCTTTGCGAGTGGACCCCTCTGAACACATTTCTGCTTCAGAAAAGAAGTTTGGAAATTTGT  
AGGTGATCAAGTTGAGACTACAAGCTCTGAAGAACTAGCTGGTCTCGAGTTTGTGAAGTTACTTTCTACTGTACCACACTTGC  
TGGTGCTGTTCAAGAAAATCTGCCAAAACCTTCAATTTACTCACTAGACACACTTCAAAGCTCACAAATGGTGAAGTAAATGC  
CAGGCCTGACTCCTAGAGCTGATCTTACTGACACGTATAAAATCATTGCTATAGCCTTTCTACTGTCAGCTTGCATTTACTTCC  
AAAACAGTCATTATCAACCAGTTGCAGGTGATAATTTGCACAGACTACCCTTTGGTGGTCAGTATCAAGACGGAAC TAAGAAGA  
TTTCTTACTTTCCGCAGCAACAATCTACTTTCACTCAGGAAACAAGCTTAATGTCCCTACACTTATCTTCACTTACTGACTGGG  
TATTGTCTCACCAATAAATTTAGTTTTAGCATTAGCCGTAATACTCACCAGCATCATTGCTACAACACACATTCTGCAACCCA  
AACAGGTCAATCAGTGCCAGGTCATCATTGACGGTGCAGCCATAGTTATAACAAATTTGCCAAAACACACCCGAAGTTCTTAAAG  
CAATCAACTTCTCCCCTTGGGAACGGGTTAAGTTTTCTCAATTTGTGAATCATATTTGTTATCTAGTTAAATTCAAACAATTTA  
ACTCAACTATGAAAACCAACCTACAGCTTCTAACCATCAGATGTACCACCAACTGCTGCTCAAGCTGGTGCCAGAGCCCA  
GCCGACTTCTCAAATCAAATCCTAATACAGCTCCTTCCCTAAGTGATTTGAAGAAGATCAAATACGTGTCAACTGTCACTTCA  
GTTGCCACGCTGCTGAAATGAGGCCCTTGGCAAGATCTTACTGCCATGGGTTTAGCAGCCAATGAGACCGGACCTGCCA  
TGTGGGACCTCGCTCGTGCTTATGCTGATGTGCAAAGTTCAAATCTGCACAACCTTATAGGTGCCACACCATCCAACCCTGCT  
TTGTCTAGACGTGCACTTGTGCACAGTTTATGCTGATCAATATCACACCCAGACAATTCTGCATGTATTTGCAAAAATTTGTTT  
GGAACATACTGTTAGACAGCAATGTGCCACCTGCCAACTGGGCAAAATTTGGGCTATCAGGAAGATACTAAGTTTGTGCTTTT  
GACTTCTTTGATGGAGTCACAAATCCAGCTAGTCTACAGCTGCTGATGGCTAATCAGGCAGCCCAATGAAAAGAGCTTGC  
TGCTCACTCGGTTGCTAAATATGGTGCCCTTGGCCGCGAAAAATCCACTGGTAACTACATCACCACCTTGGTGAAGTTA  
CACGTGGTCACATGGGCGGCGCCAAACACTATGTACGCAATTGATGCACCTCCTGAACTTAAACACTCGAACTTAAATCAGAG  
TGGGGTTTTCTATAGTTATTTTCCCTTAGTATCTAAATCTACTAAATAAAAAA

**WUR48**

GAAAACAAAACATAACACATAATCAAAAGTGACAAAACACAACATAACCACGTGAAAAACAGCGAAAGCACTTTACCACAT  
TATGTCTCGTGTTAGAAACACTTTAGAAAAGATCAGGGACCCACAAGTACAATCTAGCATTGTGAAGCAGCTTACCAACATGT  
TAGACCTGTGCTCAAGGAATCCCTAATCAACTGTCCTTATGCGCTTAATGACTATGAAGCAGACACCCCTGAGAATTTAGGTGT  
CACAATAAACCCCATGCAATCCAACACATACTCATGCGGCAGCTAAAGTTGTGGAAAATAGAATGCTCGAAATTTGTTGGACA  
CCACTTGGCCAAAGACGAGAAAAGTTACCTTCAATTTTCTCAAAGAAGCAAACCTGAGATACATGCGAAGAGCTGCTGTACATA  
AAGATGTTTTGTTAATCACAATATAGAACCAGGATTTCTTCAAGTATGATGAGGAATCTACATCTACTAGTTTCTCCGTGAA  
CACCAGGATCGTTACATCTCCGATTCTTACATTTTCAATGGAACAGCTGATGTGACCCACCTCTTTGACCGTTGCCACAATC  
TTAAAACACTGATGGCAACTGTTGTTTTACCTGTTGAAGCCATCCACAAAACAAACATCTTTATTTCCAGCGATATACTCCATTA  
TTACAATGAAGAAGTTTTGAGTATATCCCTGGTCTCATGGTGGAGGGGCATACTTTCATAAGTATGAAACATTAGACTGGCT  
CAAATACTCTAGATTCGTTGGCCAGGACCCCTTAACTGGACTCCGATACACCATAACCATTCAAATGGTGGAGAGTTTAGGAG  
CCAACCATCTTTTCTTCCAAAGAGGAAATTTGAAACACCTTTATACAGGACGTTTCAAAAAATAGCTTTGTGACCTTTCC  
TAACATCTTCCATCCCCAATGTTAATGCCACAAAGCCCATGCCAAGATCCAGGGCAATTCAGCTGTATTTATATGTCAAATC  
TGTCATAAAGGTGACACAAAGAGATATCTTTCGAAAAGTAAGGCAACTTATATCTACAGCTGAACCTGAATTTGATGACCCCTGA  
CGAACTTACACATATTTGCAATATTTTCGCATACGCTCAGAAGTAAAGTCAATCAACGACTATGACAATATGCTCAAATCAAGT  
TTTTTCAAAAACCTGTTGCACCCATGCAACATGACTGGAGGTGCATGATTGAATCTTTGGGGAAAAAGTGATTTCAATCAA

CTTTAACTGCTCTTCAATGGAAGACTTCTTTACACCATTA AAAACTGAAGAGTTAGTTATTGCTACACACTGAAATTGGCC  
AAGCAATCTGTAAGCTGCGACCACATACAAAGAAAGAAGACAATTGACCAATTTAGTCAAACAAGGCGCAGTAACATTAGCTG  
ATTTCAAAGAAGCGGACCAGCATGTGGAGTACACTCACTTTGATCCTGAGTTAAATCCACTGTTGACCCCCACCGGAGCTAT  
GAAAATGCCATCAACAATCTTGGCATTGAGATTAATGAGGATGTACCTGAAAGTTCGGCCTAATGAAACATTGCTTAAACAT  
GAAATATCTTTAGCAATGTCATCTGCTGAACATGTGCAAGCTGTTCAAGAAATGAGTCTTTACTCTTAACCCCGAAGCGGCA  
CCAATATTGCCCCCTGCACATGTTAAAACATGGGCTAGCCTTGATCTGACACTTCAAGCACTAAAAACCGTGAATCGAAGA  
TATAGTGGCTAAGCTGGAAATACAAAGAAATGAAGCTAGTTGCAGCTACCTTCAACCAATAAGGAATTGTCAAACCCAAAGGC  
TGCTGATAACAATCTCCCCCGGAATGCTTGGATCCCATTGCTTAATGCACACGGCTTCAAAGGAGATCAATTACAATACGGCC  
CAGATGGTAACTTGATACAGCCCATCAAAGACATTAACAATTCACAGCCTAGATCTGACTATCCGCTTCTCTGCCATGTGAAC  
TTGTGAAAACCTTTGAGGAAAATTAAGCGTGTCTATGCCATCCCAATAAGCCACAGGAGGGCTAGTGCTTACAGTTCTGAC  
ATCAAAAATAACAGAACTGGCAAACCTTCTCTGCAACCAAGCAAAGAATGAAAAGAAAGCTTTGCTTTCAAATGCAACATGAA  
GACATCGTCAAATCAGGTGTTGTCATACATGGTTGCGGAGGTTCTGGCAAATCCAGGCATTACAAAACCTTCTTGAGAACATT  
GGGTGATTCAAATGATTGCTGTACTGTTGTAATCCCACTGTTGAACCTTAGAAATGACTGGGTAACAACTCCATAAATTGCC  
CATGGAGCATATCAAAACATTTGAGAAAGCAATGATTCAACCTGGCTTTCCAATTGTTATATTTGATGATTACCAAGTTGCCA  
CCTGGCTACATTGAAGCATACCTATTTACCATGCCAACACTGAGCTTTTCATACTTACTGGTGATTCTAGGCAAAGCGTGTAC  
CATGAATCTAACAATGAAGCGTACATTGCCTSAATAGATGAAGCTGTTGCATACTACGCTAATTACTGCGTTTTTATTTGAATG  
CTACTCATAGAAATGTCCGTAGTTTAGCCAACAACTTGGTGTTTACAGTGAGAAAAGAGGACACTTGAAAATCACTTTTGCTT  
CACATGCCCTTACAAAAGTGCAAAGTTCCAATTTTAGTTCTTCAATGAAAAGAGTGTTATGTTAGACATTGGACATAAATC  
CATGACCTATGCTGGTTGCCAAGTTTAAACAGCACCCAAGGTACAATTCCTTGATAACCACACGCAACATTGCTCTGACA  
GAGTTCTGTACACCTGTCTGTCTCGTGCAGTTGATTCCATCCACTTCATCAATACTGGTCCCAACAATTCAGAATTTGGGATA  
AGCTTGAAGCAACACCATATCTCAAAGCCTTCAATGATGTCTATAGAGATGAAAAAACTGAAATGCTCAATTCTAAGCCTGTG  
ATGACAGTCCAACCTGAGCCTGAAGCACCTGTTACACATTTCCAATAGCAAATGAAAATAACTTAGAGAAATTAGCTTCTGCTT  
TGCCTGAAAATTTGCTAGGGAGATTTATGACAAGCATCATGGCCACTCCAACACAATCCAACTGAAAACCCGTGGTCCAA  
CTTTTCCAACATCAACAAGCGAAAGACGAAACACTCTTTGGGCTACAATTGAAGCTAGATTGTCCATAACAACCTCTGAAGCA  
AACCTCAGAGAATTTTGTCTAAGAAAGATGTTGGAGACATTCTTCTTCAATTACCATAATGCGATGTGCTTGCCTGCCGAT  
CCTGTTGACTTTGAAGAAAAGACCTGGGAGATCTGTGCCGCTGAAGTAAAAACACTTATCTTGCCAAACCCATGGCCAATCT  
TATCAATGCGGCAAGTAGACAATCACCCGACTTTGACTCTAATAAGATCTCATTATTCCTAAAGTCTCAATGGGTGAAAAAAGT  
GGAAAACCTTGAGCTATCAAATCAAACCTGGTCAGACCATAGCTGCTTTTATGCAACAAACAGTCATGTTGTATGGTACTAT  
GGCCAGGTACTTAAGGAAAATGCGGCAAAGATTCAGCCAAAACACATATTCATCAATTGTGAAACCACAACCTGATGATCTCAA  
TAAATTTGTCAAAGATGGCTGGAACCTTTAACAGAACCGCCAAAACAATGACTTCACTGCTTTTGATCAGTCACAAGATGGAGC  
AATGTGCAATTTGAAGTCATGAAAGCAAAATTTTTAACATTCCAGCTGAYGTCAATTGAAGGCTACATCAACATCAAGCTGAAT  
GCTAAAATTTTCTTGGAACACTCTCAATAATGAGACTTTCTGGTGAAGGTCCCACATTTGACGCTAACACTGAGTGTTGATT  
GCATACACTGCCACAAGATTCATATTGACAATACTGTTAAGCAAGTGTATGCCGGTGACGACATGGCATTAGATGGAGTTGT  
GAGTGAAAAGAGATCATTGAGGAAGTTACAAAATCTACTAAAACCTCACTTCAAAAACGCTGTACCCAAAACAGGTTAAAGGGGA  
TTACGCTGAATTTTGTGGTTGGACTTTTACACCAGGGGGTATAATTA AAAATCCACTTAAAATGCATGCCTCAATTATGCTGCA  
AGAAGCCATTGGCAATCTGCACACAGCAGCCAGATCTTATGCAATTGACATGAAGCATTACACCAATGGGTGACCAACTGC  
ATGACTACCTAACCCCGATGAAGCTGAACAACATTTCTAGCTGTGAGAAAGCTTACAAAACCTCATCAAGGCGAGGCCATG  
CGTCTTGGGGAGAAAAGTCCACCAAGATCAACCCATTAAGGGGTTAAGTTTTCCCAGTTTGAAATGGAAAGATCAACTTTGAT  
CAATTTACTTCTGTTACACAAATTTGAACACAAGATAAAACACTGAAGGAATCATTGTTGTGCACGGAATTGCTGGAACCTGGGAA  
AACTACATTGCTTAGGACTTTATTTTCTGCATACCCTAGCTTAGTTATAGGTTACCTTAGGCCTTGTTACTTAGATAAAGCTAAT  
AAAATTTACAAGTTTGCTTTTCTGTTTTTCAAATACCTTGTGTGACATTGTTGACGAGTACCATCTCTTAGAAAGTTTTCTG  
AACAAAACCTAGCCATTTTGGTGACCCCTGTCAGTGCCTTACATTGAAAGGTTGAGAACACCCAACTACACATCCTTCAGAA  
CACACCGATTTGGCAAATCCACTGCTGCTCTACTAAACAAGTTATTTGATCTTAACATTGAGTCAGTCAAAGCACAAGACGACA  
CAGTAGAATACTTTGATCCTTTGCGAGTGGACCCCTCTGAACACATTTCTGCTTCAGAAAAAGAAGTTTTGGAATTTGTAGGTG  
ATCAAGTTGAGACTACAAGCTCTGAAGAACAGCTGGTCTCGAGTTTGTAGTGAAGTACTTTTCTACTGTACCACACTTGCTGGTG  
CTGTTCAAGAAAATCCCGCAAACCTTCATTTCACTCACTAGACACACTTCAAAGCTCACAATTGGTGAACCTAAATGCCAGGT  
CTGACTCCTAGAGCTGATCTTACTGACACGTATAAAATCATTGCTATAGCCTTTCTACTGTCAGCTTGCAATTTACTTCCAAAAC  
AGTCATTATCAACCAGTTGCAGGTGATAATTTGCACAGACTACCCTTTGGTGGTCAAGATCAAGACGGAACCTAAGAAGATTTCT  
TACTTTCCGAGCAACAATCCTACTTTCACTCTGGGAACAAGCTTAATGTCCTCATACTTATCTTACTTACTTACACTGGGTATT  
GTCCTCACCAATAAATTTAGTTTTAGCATTAGCCGTAATACTCACAGCATCATTGCTACAACACACATTCTGCAACCCAAAACA  
GGTCAATCAATGCCAGGTGATCATTGACGGTGCAGCCATAGTTATAACAAATGTCCAAAACACACCCGGAAGTTCTTGAAGCAAT  
CAACTTCTCCCCTTGAACGGGTTAAGTTTTCTCAATTTGAAATCATATTTGTTATCTAGTTAAATTCAAACAATTTAACTCA  
ACTATGGAAAACCAACCTACAGCTTCTAACCCATCAGATGTACCACCAACTGCTGCTCAAGCTGGTGGCCAGAGCCAGCCG

ACTTCTCAAATCCTAATACAGCTCCTTCCTTAAGTGATTTGAAGAAGATCAAATACGTGTCAACTGTCACTTCAGTTGCCACGC  
CTGCTGAAATTGAGGCCCTTGGCAAGATCTTTACTGCCATGGGTTTAGCAGCCAATGAGACCGGACCTGCCATGTGGGACCT  
CGCTCGTGCTTATGCTGATGTGCAAAGTTCAAATCTGCACAACCTTATAGGTGCCACACCATCCAACCCTGCTTTGTCTAGAC  
GTGCACTTGCTGCACAGTTTGATCGTATCAATATCACACCCAGACAATTCTGTATGTATTTGCAAAAATTGTTTGGAACATACT  
GTTAGACAGCAATGTGCCACGTGCCAACTGGGCAAAATTGGGCTATCAGGAAGATACCAAGTTTGCTGCTTTTGACTTCTTTG  
ATGGAGTCACAAATCCAGCTAGTCTACAGCCTGCTGATGGCCTAATCAGGCAGCCAATGAAAAGGAGCTTGCTGCTCACTCG  
GTTGCTAAATATGGTGCCCTTGCCCGCCAGAAAATATCCACCGGTAACACTACATCACCACCCTTGGTGAAGTTACACGTGGTCA  
CATGGGCGGCAGCAACTATGTACGCAATTGATGCACCTCCTGAACTTTAAACACTCGAACTTAATCAGAGTGGGGTTTTTC  
TATAGTTATTTTCCCTTAGTATCTAAATCTACTAAATAAAAAAAAAAAAA