

אפיון מפורט של *ty-5* - לוקוס עיקרי המבקר עמידות כנגד מחלת צהבון האמיר בעגבנייה

Detailed characterization of *ty-5* – a major locus controlling resistance against tomato yellow leaf curl disease

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

אילן לוי	המחלקה לגנטיקה של צמחים, מרכז וולקני, בית דגן
משה לפידות	המחלקה לגנטיקה של צמחים, מרכז וולקני, בית דגן
סעדיה נהון	המחלקה לגנטיקה של צמחים, מרכז וולקני, בית דגן
לאה חן	המחלקה לגנטיקה של צמחים, מרכז וולקני, בית דגן
חביבה שלמה	המחלקה לגנטיקה של צמחים, מרכז וולקני, בית דגן
דנה גלברט	המחלקה לגנטיקה של צמחים, מרכז וולקני, בית דגן
ציון מחבש	המחלקה לגנטיקה של צמחים, מרכז וולקני, בית דגן

Ilan Levin, Dep. of Vegetable Research, the Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: vclevini@volcani.agri.gov.il

Moshe Lapidot, Dep. of Vegetable Research, the Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: lapidotm@volcani.agri.gov.il

Saadia Nahon, Dep. of Vegetable Research, the Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: sahadia@volcani.agri.gov.il

Leah Chen, Dep. of Vegetable Research, the Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: chenleah@volcani.agri.gov.il

Haviva Shlomo, Dep. of Vegetable Research, the Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: haviva@volcani.agri.gov.il

Dana Gelbart, Dep. of Vegetable Research, the Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: danag@volcani.agri.gov.il

Zion Machbosh, Dep. of Vegetable Research, the Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: **None**

נובמבר 2015

אב תשע"ג

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא מחק את המיותר*

* חתימת החוקר _____

תקציר

1. הצגת הבעיה: מחלת צהבון האמיר נגרמת על-ידי וירוסים שונים, בכללם וירוס צהבון האמיר. המחלה מהווה איום מוחשי, מתמשך ומתרחב לגידול עגבניות בארץ ובעולם. מקובל לחשוב כי הזרד היעילה ביותר להתמודדות עם מחלה זו היא באמצעים גנטיים. לאחרונה זיהינו לוקוס עיקרי, *ty-5*, הקובע עמידות לוורוס צהבון האמיר ולוורוסים נוספים ממשפחה זו. במהלך המחקר שלבנו מגוון של טכנולוגיות קלאסיות של הכלאות חוזרות, טכנולוגיות וירולוגיות, טכנולוגיות מולקולאריות בסיסיות של שיבוט מבוסס מפה ורצף, וכן שיטות מולקולאריות טרנסגניות על מנת להגיע לאפיון מפורט של הלוקוס *ty-5*. היפותזת העבודה שלנו אמרה כי אפיון מפורט זה ייתרום לייעול משמעותי של פיתוח עתידי של זני עגבניה עמידים הן במישור הטיפוחי הקלאסי והן באמצעות הנדסה גנטית תוך שילוב מושכל של גנים למניעת אפקטים קולטראליים שליליים. היפותזה זאת נתמכת בממצאים שפרסמנו במהלך תקופת המחקר, המראים כי שילוב של שניים או יותר של גנים כאלה מקנה לצמחים הנושאים אותם עמידות שעולה באורח מובהק על זו שמבוקרת ע"י גן בודד (Hutton et al., 2015).

2. מהלך ושיטות עבודה: 1. מיפוי עדין ופונקציונאלי של הגן המבקר את העמידות לוורוס צהבון האמיר בלוקוס *ty-5* (Lapidot et al., 2015); 2. ייצור קווי מיקרו-אינטרוגרסיה באזור הגן *ty-5* במטרה לבחון את משמעותם ההורטיקולטורית (Fogel, 2013, Lapidot et al., 2015); 3. ניתוח האפקט הייחודי של *ty-5 chilense* וכן את האפקט המשולב שלו עם *ty-5*; 4. ניתוח הרפליקציה של הוורוס בקווי אינטרוגרסיה המכילים את הגן *ty-5* בהשוואה לקו המקורי, TY172, ממנו נלקח הגן; 5. ניתוח הפרופיל התעוקי של הגן *ty-5* (Lapidot et al., 2015) וגנים נוספים המצויים בקרבנו, כולל *SINACI*, במטרה להבין את מגמות הבקרה התעוקית של הגנים בלוקוס זה.

3. תוצאות עיקריות: 1. פענוח זהות הגן המוביל לעמידות לוורוס צהבון האמיר בעגבניה (Lapidot et al., 2015); 2. הלוקוס *ty-5*, כפי שנבחן בדור BC₃F₂, נושא עמו אפקטים שליליים על מרכיבי יכולת אפקטים שליליים אלו התמתנו באורח ניכר בדור BC₄F₃; 3. ל-*ty-5 chilense* אין אפקט בהקניית עמידות לוורוס צהבון האמיר וכן אינו מצוי באינטראקציה עם *ty-1*; 4. זוהה לוקוס נוסף המבקר את העמידות לוורוס בקו TY172 אשר יחד עם *ty-5* תורם משמעותית לפחיתה ברמת הסימפטומים; 5. הרפליקציה של הוורוס בקווי אינטרוגרסיה המכילים את הגן *ty-5* מעוכבת במידה רבה וברב המקרים אינה שונה באופן סטטיסטי מ-TY172; 6. הגן *ty-5 (PELOTA)* וכן הגן *SINACI* אינם מבוקרים תעוקית הן בצמחים מודבקים והן בצמחים שאינם מודבקים, עמידים או רגישים.

חשוב לציין כי חלק ניכר מתוצאות אלו פורסם בכתבי עת מדעיים בינלאומיים, חלקם בכתב העת היוקרטי Plos Genetics (Lapidot et al., 2015).

4. מסקנות והמלצות: 1. הגן המבקר עמידות לוורוס צהבון האמיר בלוקוס *ty-5* הינו *PELOTA* והבקרה שלו נקבעת ע"י שינוי בחומצה האמינית Valine בקווים רגישים לחומצה האמינית Glycine בקווים עמידים המבוססים על TY172 (Fogel, 2013, Lapidot et al., 2015); 2. הגן *SINACI* אינו קשור לבקרת העמידות בלוקוס *ty-5*; 3. ניתן להימנע מהאפקטים השליליים של הלוקוס *ty-5* על מרכיבי

יבול באמצעות הכלאות חוזרות תוך כדי שימוש בסמן 1.7.א שפיתחנו על בסיס הרצף של הגן *PELOTA*. 4. ל- *ty-5 chilense* אין אפקט כלשהוא על העמידות לכדו או בשילוב עם *Ty-1*; 5. זוהה לוקוס נוסף המבקר את העמידות לוירוס בקו TY172 אשר יחד עם *ty-5* תורם משמעותית לפחיתה ברמת הסימפטומים.

רשימת פרסומים

- Lapidot, M., Levin, I., and Reuveni, M. 2012.
An isolated nucleotide sequence responsible for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* disease at the tomato *Ty-5* locus and uses thereof.
US patent application 61/704,500
- Fogel, D. 2013.
Identification of the gene controlling TYLCV resistance at the *ty-5* locus and its characterization using transgenic lines.
Master of Science Submitted to the Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment of the Hebrew University of Jerusalem.
- Levin, I., Reuveni, M., Evenor, D., Gelbart, D., Chen, L., Nahon, S., Shlomo, H., Machbash, Z., and Lapidot, M. 2013.
Cloning and analysis of the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance gene *Ty-5*.
Tomato Breeders Round Table, Chiang Mai, Thailand (P14).
- Hutton, S.F., Scott, J.W., Shekasteband, R., Levin, I. and Lapidot, M. 2015.
Combinations of *Ty* resistance genes generally provide more effective control against begomoviruses than do single genes.
Acta Hort. 1069:59-64.
- Reuveni, M., Debbi, A., Kutsher, Y., Zemach, H., Belausov, E., Gelbart, D., Levin I., and Lapidot, M. 2015.
Tomato yellow leaf curl virus effects on chloroplast biogenesis and cellular structure.
Physiol. and Mol. Plant Pathol. 92: 51-58.
- Lapidot, M., Karniel, U., Gelbart, D., Fogel, D., Evenor, D., Kutsher, Y., Makhbush, Z., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Reuveni, M., and Levin, I. 2015.
A novel route controlling begomovirus resistance by the messenger RNA surveillance factor Pelota.
Plos Genet., 11(10):e1005538. doi: 10.1371/journal.pgen.1005538.

מבוא

מחלת צהבון האמיר נגרמת על-ידי כ- 50 ווירוסים שונים, בכללם ווירוס צהבון האמיר, בעלי השפעה מזיקה נרחבת ביותר לעגבניה התרבותית, המהווה איום מוחשי, מתמשך ומתרחב לגידול עגבניות בארץ ובעולם. מניעה של נזקים אלו באמצעים פיסיים או באמצעות קוטלי חרקים כנגד כנימת עש הטבק, המעבירה ווירוסים אלו, הם יקרים, חלקם אינם יעילים מספיק וחלקם גורמים לנזקים חמורים לסביבה ולאדם. לכן, הדרך היעילה ביותר להתמודדות עם מחלות אלו בפרט ומחלות ויראליות בכלל היא באמצעים גנטיים. כיוון שהעגבנייה התרבותית רגישה לוורוסים אלו, הפכו מיני בר של העגבנייה התרבותית למקור חשוב של גנים לעמידות כנגד הנגע זה. עד כה זוהו על ידינו ועל ידי קבוצות אחרות חמישה לוקוסים עיקריים הקשורים לעמידות אשר מופו לגנום העגבנייה, אך לא ידוע הרבה על מנגנון ההורשה להם, על מנגנון העמידות ובוודאי שלא על הגנים הקובעים אותה. לאחרונה מיפנו לוקוס עיקרי,

ty-5 , הקובע עמידות לווירוס צהבון האמיר ולווירוסים נוספים המחוללים את מחלת צהבון האמיר בקו הגנטי TY172 אשר מציג טובה כנגד וירוסים אלה. לוקוס זה מתמפה לאזור טלומרי עתיר רקומבינציה על כרומוסום 4 אשר רוצף במהלך השנים האחרונות. במהלך המחקר שלבנו מגוון של טכנולוגיות קלאסיות של הכלאות חוזרות, טכנולוגיות וירולוגיות, טכנולוגיות מולקולאריות בסיסיות של שיבוט מבוסס מפה ורצף, וכן שיטות מולקולאריות טרנסגניות על מנת להגיע לאפיון מפורט של הלוקוס ty-5. היפותזת העבודה שלנו אמרה כי אפיון מפורט זה ייתרום לייעול משמעותי של פיתוח עתידי של זני עגבניה עמידים הן במישור הטיפוחי הקלאסי והן באמצעות הנדסה גנטית תוך שילוב מושכל של גנים למניעת אפקטים קולטראליים שליליים. היפותזה זאת נתמכת בממצאים שקבלנו במהלך תקופת המחקר, המראים כי שילוב של שניים או יותר של גנים כאלה מקנה לצמחים הנושאים אותם עמידות שעולה באורח מובהק על זו שמבוקרת ע"י גן בודד.

פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שנתקבלו לתקופת הדו"ח

1. מיפוי עדין ופונקציונאלי של הגן המבקר את העמידות לווירוס צהבון האמיר בלוקוס ty-5

במהלך המחקר השלמנו את המיפוי העדין והפונקציונאלי של הלוקוס ty-5 והתברר, ללא ספק, כי הגן המבקר את העמידות לווירוס בלוקוס זה הינו *PELOTA*. המיפוי העדין אשר ביצענו הוביל אותנו לאינטרוגרסיה של 425 בסיסים (איור 1) המכילה שני שינויים בין הקו הרגיש M-82 לקו העמיד TY172: החלפה של T ל- A באזור הפרומטר של הגן והחלפה של הבסיס T ל- G בגן עצמו. השינוי האחרון, שהוא היחיד ברצף המקודד של הגן ב- TY172, מוביל לשינוי של החומצה האמינית Valine בקווים רגישים לחומצה האמינית Glycine בקו העמיד TY172. חשוב לציין ששינוי זה בחומצת האמינו מופיע בדומיין הראשון של הגן אשר נחשב לדומיין הפעיל שלו בשלב מחזור הריבוזומים של תהליך התירגום.

איור 1. האינטרוגרסיה המכילה את הגורם המבקר את העמידות לווירוס צהבון האמיר בלוקוס ty-5 (קודון ההתחלה של הגן *PELOTA* מסומן בקו תחתי ואילו שני השינויים שזוהו ברצף בין הקו הרגיש M-82 לקו העמיד TY172 מסומנים באדום).

```

M-82      TACATATTTATGAAAGTTTTCCAAAAATATACTTTTTTTTTTAAAAAAAAAATCCATAA
TY172    TACATATTTATGAAAGTTTTCCAAAAATATACTTTTTTTTTTAAAAAAAAAATCCATAA
*****
M-82      ATATAAATTTGTTAAAAGAAAAGGTAAGAAACATCATATATAACACAACAATATATAA
TY172    ATATAAATTTGTTAAAAGAAAAGGTAAGAAACATCATATATAACACAACAATATATAA
*****
M-82      AAAAATATTTTAAAATAAAAATACTAATTTTAAATTGCAAAATGAGGGTATATTGG
TY172    AAAAATATTTTAAAATAAAAATACTAATTTTAAATTGCAAAATGAGGGTATATTGG
*****
M-82      TCATTTTCTCCCAAAAAATAAAAATCAAGTCCTTCTTCAACAAGGTTAGGAAAAACCT
TY172    TCATTTTCTCCCAAAAAATAAAAATCAAGTCCTTCTTCAACAAGGTTAGGAAAAACCT
*****
M-82      AAAACATTAAGGACACAAACCGTTAAAACCTATAAAAAGTCTTTTCTCCATTGAACTG
TY172    AAAACATTAAGGACACAAACCGTTAAAACCTATAAAAAGTCTTTTCTCCATTGAACTG
*****
M-82      AAGCAAATCTCATACGAAAAAATTTCTATAAAAAGTTGTTTAAATTCATCTTTTTTCTG
TY172    AAGCAAATCTCATACGAAAAAATTTCTATAAAAAGTTGTTTAAATTCATCTTTTTTCTG
*****
M-82      CTATTTACATGCAAAATTATTGAATTTTCATTAAGTTGATAAATTTGTTTCATTCAATA

```

TY172 CTATTTACATGCAAATTTATGAATTTTCATTAAGTTGATAAAATTTGTTTCATTCAATA

 M-82 TGAAGATTGTTTCGTAGAGACTTTGTTTCCTGATGGTTCTGGTAGTGTAAAGGTAACCTTTT
 TY172 TGAAGATTGTTTCGTAGAGACTTTGTTTCCTGATGGTTCTGGTAGTGTAAAGGTAACCTTTT

במטרה לברר האם השינוי באזור הפרומוטר של הגן *PELOTA* קשור לפונקציונאליות התעתוקית שלו בחנו את רמת התעתיקים של הגן בצמחים עמידים (TY172) מול שני קווים רגישים (R13 ו-M-82) מודבקים ולא מודבקים בוורוס לאורך 28 יום ממועד ההדבקה. התוצאות המוצגות בטבלה 1 מראות כי רמת התעתיקים של הגן אינה שונה בין צמחים עמידים לרגישים מודבקים בוורוס או לא מודבקים. תוצאות אלו מראות כי השינוי שאיתרנו בגן הוא זה הקובע את העמידות לוורוס ולא השינוי שמצאנו באזור הפרומוטר.

טבלה 1. רמת התעתיקים של הממוצעת של הגן *PELOTA* בצמחים עמידים ורגישים, מודבקים בוורוס צהבון האמיר ולא מודבקים, לאורך 28 ימים ממועד ההדבקה (שני הניסויים בוצעו בשנים שונות ולכן נותחו בנפרד; אותיות זהות מעל לממוצע מציינות כי אין הבדלים מובהקים בין הממוצעים בכל יום מהדבקה בנפרד).

ימים מהדבקה							
ניסוי	קו	טיפול	מס' צמחים	7	14	21	28
1	TY172	מודבק	10	2.2 ^A ±0.1	4.4 ^A ±0.9	1.1 ^A ±0.2	1.9 ^A ±0.2
		לא מודבק	10	2.1 ^A ±0.2	2.9 ^A ±0.4	1.1 ^A ±0.1	2.0 ^A ±0.3
R13	R13	מודבק	10	1.3 ^A ±0.4	2.3 ^A ±0.3	1.1 ^A ±0.2	1.4 ^A ±0.3
		לא מודבק	10	2.6 ^A ±0.5	2.6 ^A ±0.3	1.0 ^A ±0.2	1.6 ^A ±0.2

ימים מהדבקה							
ניסוי	קו	טיפול	מס' צמחים	7	14	21	28
2	TY172	מודבק	10	1.4 ^A ±0.3	2.7 ^A ±0.6	3.2 ^A ±0.6	1.1 ^A ±0.3
		לא מודבק	10	1.5 ^A ±0.2	2.1 ^A ±0.3	4.3 ^A ±1.1	1.1 ^A ±0.3
M-82	M-82	מודבק	10	1.5 ^A ±0.1	1.1 ^A ±0.2	3.1 ^A ±0.7	1.1 ^A ±0.2
		לא מודבק	10	2.4 ^A ±0.3	1.6 ^A ±0.3	1.6 ^A ±0.2	1.7 ^A ±0.4

מלבד זאת, אימתנו במהלך תקופת המחקר כי הקו העמיד TY172 מכיל, בנוסף ל-*ty-5*, אתר נוסף הקובע עמידות באזור הגן המבקר עמידות בלוקוסים שכוננו בעבר: *Ty-1* ו-*Ty-3*. גן זה זוהה לאחרונה כ- *DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerase (RDR)* ונקבע כי שני האתרים, *Ty-1* ו-*Ty-3* הם אללים אלטרנטיביים של אותו הגן. ריצוף של הגן שבצענו בקו העמיד TY172 הראה כי האלל בקו זה שונה מהאללים העמידים אשר זוהו עד כה בלוקוס זה (*Ty-1* ו-*Ty-3*) ומהאלל הרגיש (איור 2). לכן אנו מכנים אלל זה *Ty-1^V*.

על מנת לבחון את ההשפעה של *Ty-1^V* על העמידות לצהבון ואת השפעת הגומלין שלו עם *ty-5*, ייצרנו והדבקנו אוכלוסיית *F₂* גדולה שמקורה מההכלאה בין TY172 לבין R13. התוצאות המוצגות בטבלה 2 ממחישות את ההשפעות הללו ומוכיחות כי *Ty-1^V* תורם לעמידות. כתוצאה ממצאים אלה

בססנו מערכת גנטית שמטרתה לזהות את הגן המבקר עמידות באתר $Ty-1^V$. למרות שקיימת סבירות גבוהה כי מדובר באלל נוסף לאלו שזוהו בעבר ($Ty-1$ ו- $Ty-3$), איננו יכולים לשלול לחלוטין את האפשרות כי מדובר בגן אחר. בכל מקרה, הנתונים המוצגים בטבלה 2 ממחישים שוב את היתרון הקיים בשילוב של שני גנים על העמידות לוורוס צהבון האמיר.

איור 2. השוואה בין רצף הנוקליאוטידים של הגן RDR בקו TY172 ($Ty-1^V$) לבין רצף הנוקליאוטידים של הגן מגנוטיפ הנושא את $Ty-1$ (TY52), מגנוטיפ הנושא את $Ty-3$ (FLA726) ומגנוטיפ רגיש (MoneyMaker, +).

$Ty-1^V$	ATGGGTGATCCGTTGATTGAAGAAATTGATGTTT-----TGGATGCACCTTTA
+	ATGGGTGATCCGTTGATTGAAGAAATTGATGTTT-----TGGATGCACCTTTA
$Ty-3$	ATGGGTGATCCGTTGATTGAAGAAATTGATGTTTCTTCTTGTATACTGGATGCACCTTTA
$Ty-1$	ATGGGTGATCCGTTGATTGAAGAAATTGATGTTTCTTCTTGTATACTGGATGCACCTTTA *****
$Ty-1^V$	CCATATTCTGTAGAGACGATGCTTGATAGAATCTGCAAGGAGCAGGGGCAAAAACCACCG
+	CCATATTCTGTAGAGACGATGCTTGATAGAATCTGCAAGGAGCAGGGGCAAAAACCACCG
$Ty-3$	CCATATTCTGTAGAGACGATGCTTGATAGAATCTGCAAGGAGCAGGGGCAAAAACCACCG
$Ty-1$	CCATATTCTGTAGAGACGATGCTTGATAGAATCTGCAAGGAGCAGGGGCAAAAACCACCG *****
$Ty-1^V$	TGTACTGGCATTAGAAGGAGGCTGAGCTCTATTGGTGAAAAAGGGTCATTAGAAATGCTC
+	TGTACTGGCATTAGAAGGAGGCTGAGCTCTATTGGTGAAAAAGGGTCATTAGAAATGCTC
$Ty-3$	TGTACTGGCATTAGAAGGAGGCTGAGCTCTATTGGTGAAAAAGGGTCATTAGAAATGCTC
$Ty-1$	TGTACTGGCATTAGAAGGAGGCTGAGCTCTATTGGTGAAAAAGGGTCATTAGAAATGCTC *****
$Ty-1^V$	AAAATAATATCACGTCGTCCTATCAAGAAGAGTCTCTCTGCTTTTCTTGTTTACATGATT
+	AAAATAATATCACGTCGTCCTATCAAGAAGAGTCTCTCTGCTTTTCTTGTTTACATGATT
$Ty-3$	AAAATAATATCACGTCGTCCTATCAAGAAGAGTCTCTCTGCTTTTCTTGTTTACATGATT
$Ty-1$	AAAATAATATCACGTCGTCCTATCAAGAAGAGTCTCTCTGCTTTTCTTGTTTACATGATT *****
$Ty-1^V$	GATCGCTACCCGGATTGTCTCTCCTCTTCCTCTAGCCCCTTCAATAGTCTACTCAAACGC
+	GATCGCTACCCGGATTGTCTCTCCTCTTCCTCTAGCCCCTTCAATAGTCTACTCAAACGC
$Ty-3$	GATCGCTACCCGGATTGTCTCTCCTCTTCCTCTAGCCCCTTCAATAGTCTACTCAAACGC
$Ty-1$	GATCGCTACCCGGATTGTCTCTCCTCTTCCTCTAGCCCCTTCAATAGTCTACTCAAACGC *****
$Ty-1^V$	TCTTCTTCCCCTCGTCTCTTTCCATCTCCAGAGGGTAAACGTTTACAAGGTGAAAGTTCT
+	TCTTCTTCCCCTCGTCTCTTTCCATCTCCAGAGGGTAAACGTTTACAAGGTGAAAGTTCT
$Ty-3$	TCTTCTTCCCCTCTTCTATTTCCATCTCCAGAGGGTAAACGTTTACTTGGTGAAAGTTCT
$Ty-1$	TCTTCTTCCCCTGTTCTATTTCCATCTCCAGAGGGTAAACGTTTACAAGGTGAAAGTTCT *****
$Ty-1^V$	TCTAAATCAAAGCTTGAGATGGGCTTATTGGCCTGTGCAAGCCCTCAGAAAGTTGCTCGC
+	TCTAAATCAAAGCTTGAGATGGGCTTATTGGCCTGTGCAAGCCCTCAGAAAGTTGCTCGC
$Ty-3$	TCTAAATCAAAGCTTGAGATGGGCTTATTGGCCTGTGCAAGCCCTCAGAAAGTTGCTCGC
$Ty-1$	TCTAAATCAAAGCTTGAGATGGGCTTATTGGCCTGTGCAAGCCCTCAGAAAGTTGCTCGC *****
$Ty-1^V$	CAGTTATCATTTTGCAGGAGCCTGAATCTAACTGTAGAAGAACCTCCCCTTATGTCAGC
+	CAGTTATCATTTTGCAGGAGCCTGAATCTAACTGTAGAAGAACCTCCCCTTATGTCAGC
$Ty-3$	CAGTTATCATTTTGCAGGAGCCTGAATCTAACTGTAGAAGAACCTCCCCTTATGTCAGC
$Ty-1$	CAGTTATCATTTTGCAGGAGCCTGAATCTAACTGTAGAAGAACCTCCCCTTATGTCAGC *****

Ty-1^V CAACAGTTGATGATCCTCAATGAACTTGAATTTAGAAAATTGTTTTTGGTACTGAGCTAC
 + CAACAGTTGATGATCCTCAATGAACTTGAATTTAGAAAATTGTTTTCTGGTACTGAGCTAC
Ty-3 CAACAGTTGATGATCCTCAATGAACTTGAATTTAGAAAATTGTTTTTGGTACTGAGCTAC
Ty-1 CAACAGTTGATGATCCTCAATGAACTTGAATTTAGAAAATTGTTTTTGGTACTGAGCTAC

Ty-1^V ATTGGATGCAACAAGTTGGAAGATGTTATATCCCCTCAAATTGCTGATGATATTGTAAGA
 + ATTGGATGCAACAAGTTGGAAGATGTTATATCCCCTCAAATTGCTGATGATATTGTAAGA
Ty-3 ATTGGATGCAACAAGTTGGAAGATGTTATATCCCCTCAAATTGCTGATGATATTGTAAGA
Ty-1 ATTGGATGCAACAAGTTGGAAGATGTTATATCCCCTCAAATTGCTGATGATATTGTAAGA

Ty-1^V AAGAAAATCTTTCAATGACTGATTTTGAATCAGAAATTTGGAATGCTTTTGGAAAAGCA
 + AAGAAAATCTTTCCATGACTGATTTTGAATCAGAAATTTGGAATGCTTTTGGAAAAGCA
Ty-3 AAGAAAATCTTTCCATGACTGATTTTGAATCAGAAATTTGGAATGCTTTTGGAAAAGCA
Ty-1 AAGAAAATCTTTCCATGACTGATTTTGAATCAGAAATTTGGAATGCTTTTGGAAAAGCA

Ty-1^V TGTTATGCTGTGTCAGATAGATCAAAGTACTTAGACTGGAATTGCAGAAAGACACATATC
 + TGTTATGCTGTGTCAGATAGATCAAAGTACTTAGACTGGAATTGCAGAAAGACACATATC
Ty-3 TGTTATGCTGTGTCAGATAGATCAAAGTACTTAGACTGGAATTGCAGAAAGACACATATC
Ty-1 TGTTATGCTGTGTCAGATAGATCAAAGTACTTAGACTGGAATTGCAGAAAGACACATATC

Ty-1^V TACTATTGCCACATTAAGCAGAACGGGATACTGTACCTTCAAGGGTCCATACTTGAACACA
 + TACTATTGCCACATTAAGCAGAACGGGATACTGTTCCTTCAAGGGTCCATACTTGAACACA
Ty-3 TACTATTGCCACATTAAGCAGAACGGGATGCTGTACCTTCAAGGGTCCATACTTGAACACA
Ty-1 TACTATTGCCACATTAAGCAGAACGGGATGCTGTACCTTCAAGGGTCCATACTTGAACACA

Ty-1^V TTAAGGACTCACTTACAGAGAGCCCTGGGAGATGACAATGTACTGATTGTAAAATTTGTT
 + TTAAGGACTCACTTACAGAGAGCCCTGGGAGATGACAATGTACTGATTGTAAAATTTGTT
Ty-3 GCAAGGACTCACTTACAGAGAGCCCTGGGAGATGACAATGTACTGATTGTCAAATTTGTT
Ty-1 GCAAGGACTCACTTACAGAGAGCCCTGGGAGATGACAATGTACTGATTGTCAAATTTGTT

Ty-1^V GAAGATACAAGTTGTGCCAATATAATTCTCGAGGAAGGCATTCTTGTGGCTTGAGACGT
 + GAAGATACAAGTTGTGCCAATATAATTCTCGAGGAAGGCATTCTTGTGGCTTGAGACGT
Ty-3 GAAGATACAAGTTGTGCCAATATAATTCTCGAGGAAGGCATTCTTGTGGCTTGAGACGT
Ty-1 GAAGATACAAGTTGTGCCAATATAATTCTCGAGGAAGGCATTCTTGTGGCTTGAGACGT

Ty-1^V TACCGTTTCTTTGTGTATAAAGATGATAAAGAGAGGAAGAAAAGTCCAGCTATGATGAAG
 + TACCGTTTCTTTGTGTATAAAGATGATAAAGAGAGGAAGAAAAGTCCAGCTATGATGAAG
Ty-3 TACCGTTTCTTTGTGTATAAAGATGATAAAGAGAGGAAGAAAAGTCCAGCTATGATGAAG
Ty-1 TACCGTTTCTTTGTGTATAAAGATGATAAAGAGAGGAAGAAAAGTCCAGCTATGATGAAG

Ty-1^V ACAAAAACCTGCTTCTTTGAAGTGCTACTTTGTTAGGTTTGGTCCATTGGAACCTGCAAT
 + ACAAAAACCTGCTTCTTTGAAGTGCTACTTTGTTAGGTTTGGTCCATTGGAACCTGCAAT
Ty-3 ACAAAAACCTGCTTCTTTGAAGTGCTACTTTGTTAGGTTTGGTCCATTGGAACCTGCGAT
Ty-1 ACAAAAACCTGCTTCTTTGAAGTGCTACTTTGTTAGGTTTGGTCCATTGGAACCTGCGAT

Ty-1^V GATGGAGAATCCTATGTATTTTCTACCAAACAATCAGTCAAGCAAGGTGTAAATTCATG
 + GATGGAGAATCCTATGTATTTTCTACCAAACAATCAGTCAAGCAAGGTGTAAATTCATG
Ty-3 GATGGAGAATCCTATGTATTTTCTACCAAACAATCAGTCAAGCAAGGTGTAAATTCATG
Ty-1 GATGGAGAATCCTATGTATTTTCTACCAAACAATCAGTCAAGCAAGGTGTAAATTCATG

Ty-1^V CATGTGCATATGGTTTCTAATATGGCAAATATGCAGCCAGGCTTTCCTTAATTCTATCA
 + CATGTGCATATGGTTTCTAATATGGCAAATATGCAGCCAGGCTTTCCTTAATTCTATCA
Ty-3 CATGTGCATATGGTTTCTAATATGGCAAATATGCAGCCAGGCTTTCCTTAATTCTATCA
Ty-1 CATGTGCATATGGTTTCTAATATGGCAAATATGCAGCCAGGCTTTCCTTAATTCTATCA

Ty-1^V AAGACGATTAAGCTTCAAACAGATCTTGATTCTGTCACCATTGAAAGAATTGAAGATATA
 + AAGACGATTAAGCTTCAAACAGATCTTGATTCTGTCACCATTGAAAGAATTGAAGATATA
Ty-3 AAGACTATTAAGCTTCAAGTGGATCTTGATTCTGTCACCATTGAAAGAATTGAAGATATA
Ty-1 AAGACTATTAAGCTTCAAGTGGATCTTGATTCTGTCACCATTGAAAGAATCGAAGATATA

Ty-1^V CTTTGTCTGGGATGAAAATGGTTGTATTATTCAAGATGAAGACGGCGAACCTCGTATACAT
 + CTTTGTCTGGGATGAAAATGGTTGTATTATTCAAGATGAAGACGGCGAACCTCGTATACAT
Ty-3 CTTTGTCTGGGATGAAAATGGTTGTATTATTCAAGATGAAGACGGCGAACCTCGTATACAT
Ty-1 CTTTGTCTGGGATGAAAATGGTTGTATTATTCAAGATGAAGACGGCGAACCTCGTATACAT

Ty-1^V ACTGATGGTACTGGTTTTCATATCAGAAGATTTAGCTATGCATTGTCCCAAAGATTTTTCA
 + ACTGATGGTACTGGTTTTCATATCAGAAGATTTAGCTATGCATTGTCCCAAAGATTTTTCA
Ty-3 ACTGATGGTACTGGTTTTCATATCAGAAGATTTAGCTATGCATTGTCCCAAAGATTTTTCA
Ty-1 ACTGATGGTACTGGTTTTCATATCAGAAGATTTAGCTATGCATTGTCCCAAAGATTTTTCA

Ty-1^V AAAGCAGAATATATAAAAAGATGAAAATTATGAGAATTTTGTGATATCGTGGACCTTGAT
 + AAAGCAGAATATATAAAAAGATGAAAATTATGAGAATTTTGTGATATCGTGGACCTTGAT
Ty-3 AAAGCAGAATATATAAAAAGATGAAAATTATGAGAATTTTGTGATATCGTGGACCTTGAT
Ty-1 AAAGCAGAATATATAAAAAGATGAAAATTATGAGAATTTTGTGATATCGTGGACCTTGAT

Ty-1^V GACGTGAATGTAGAAAGAAGAGTGAGTGTATCTCGCAATAGGGAACCGCCTTTGTTGATG
 + GACGTGAATGTAGAAAGAAGAGTGAGTGTATCTCGCAATAGGGAACCGCCTTTGTTGATG
Ty-3 GACGTGAATGTAGAAAGAAGAGCGAGTGTATCTGGGAATAGGGAACCGCCTTTGTTGATG
Ty-1 GACGTGAATGTAGAAAGAAGAGCGAGTGTATCTGGGAATAGGGAACCGCCTTTGTTGATG

Ty-1^V CAGTGCCGTTTGTCTTCAATGGTTGTGCTGTGAAGGGGACTTTTCTTGTC AATAGAAAG
 + CAGTGCCGTTTGTCTTCAATGGTTGTGCTGTGAAGGGGACTTTTCTTGTC AATAGAAAG
Ty-3 CAGTGCCGTTTGTCTTCAACGGTTGTGCTGTGAAGGGGACTTTTCTTGTC AATAGAAAG
Ty-1 CAGTGCCGTTTGTCTTCAACGGTTGTGCTGTGAAGGGGACTTTTCTTGTC AATAGAAAG

Ty-1^V ATTGGATCACGAAAAATTCATATTAGACCCTCAATGGTGAAGGTTGAGATAGACCCAACA
 + ATTGGATCACGAAAAATTCATATTAGACCCTCAATGGTGAAGGTTGAGATAGACCCAACA
Ty-3 ATTGGATCACGAAAAATTCATATTAGACCCTCAATGGTGAAGGTTGAGATAGACCCAACA
Ty-1 ATTGGATCACGAAAAATTCATATTAGACCCTCAATGGTGAAGGTTGAGATAGACCCAACA

Ty-1^V ATTTCAAGTATACCAACTTTTGACTCATTGGAGATAGTTGCAATCAGTCATAGACCAAAT
 + ATTTCAAGTATACCAACTTTTGACTCATTGGAGATAGTTGCAATCAGTCATAGACCAAAT
Ty-3 ATTTCAAGTATACCAACTTTTGACTCATTGGAGATAGTTGCAATCAGTCATAGACCAAAT
Ty-1 ATTTCAAGTATACCAACTTTTGACTCATTGGAGATAGTTGCAATCAGTCATAGACCAAAT

Ty-1^V AAGGCATATCTGTCCAAGAATTTAATCTCTCTGCTGAGCTACGGAGGAGTCCATAAAGAA
 + AAGGCATATCTGTCCAAGAATTTAATCTCTCTGCTGAGCTACGGAGGAGTCCATAAAGAA
Ty-3 AAGGCATATCTGTCCAAGAATTTAATCTCTCTGCTGAGCTACGGAGGAGTCCATAAAGAA
Ty-1 AAGGCATATCTGTCCAAGAATTTAATCTCTCTGCTGAGCTACGGAGGAGTCCATAAAGAA

Ty-1^V TACTTTATGGAAC TTTTGGGAAGTGC GCTGGAAGAGACGAAACAAGTATATTTGAGGAAA

+ TACTTTATGGAAC TTTTGGGAAGTGC GCTGGAAGAGACGAAACAAGTATATTTGAGGAAA
 Ty-3 TACTTTCTGGAGCT TTTTGGGAAGTGC ACTGGAAGAGACGAAACAAGTATATTTGAGGAAA
 Ty-1 TACTTTCTGGAGCT TTTTGGGAAGTGC ACTGGAAGAGACGAAACAAGTATATTTGAGGAAA

 Ty-1^V CGTGCAGCTCTAAAAGTTGCTATCAACTATAGAGAAATGGATGATGAATGTCTAACAGCA
 + CGTGCAGCTCTAAAAGTTGCTATCAACTATAGAGAAATGGATGATGAATGTCTAACAGCA
 Ty-3 CGGGCAGCTCTAAAAGTTGCTATCAACTATAGAGAAATGGATGATGAATGTCTAACAGCA
 Ty-1 CGGGCAGCTCTAAAAGTTGCTATCAACTATAGAGAAATGGATGATGAATGTCTAACAGCA
 **
 Ty-1^V AGGATGATATCGTCTGGGATACCTCTCAATGAACCTCATCTCCATGCTCGCTTGTCTAGG
 + AGGATGATATCGTCTGGGATACCTCTCAATGAACCTCATCTCCATGCTCGCTTGTCTAGG
 Ty-3 AGGATGATATCGTCTGGGATACCTCTCAATGAACCTCATCTCCATGTTTCGCTTGTCTAGG
 Ty-1 AGGATGATATCGTCTGGGATACCTCTCAATGAACCTCATCTCCATGTTTCGCTTGTCTAGG

 Ty-1^V CTTGCAAAGATTGAAAGA ACTAAGCTTAGAGGAGGAAAGCTTCCTATAAGTGACAGTTTT
 + CTTGCAAAGATTGAAAGA ACTAAGCTTAGAGGAGGAAAGCTTCCTATAAGTGACAGTTTT
 Ty-3 CTTGCAAAGATTGAAAGA ACTAAGCTTAGAGGAGGAAAGCTTCCTATAAGTGACAGTTTT
 Ty-1 CTTGCAAAGATTGAAAGA ACTAAGCTTAGAGGAGGAAAGCTTCCTATAAGTGACAGTTTT

 Ty-1^V TATCTTATGGGAACAGCTGACCCCACTGGTGTACTGGAAAGCAATGAAGTCTGTGTTATT
 + TATCTTATGGGAACAGCTGACCCCACTGGTGTACTGGAAAGCAATGAAGTCTGTGTTATT
 Ty-3 TATCTTATGGGAACAGCTGACCCCACTGGTGTACTGGAAAGCAATGAAGTCTGTGTTATT
 Ty-1 TATCTTATGGGAACAGCTGACCCCACTGGTGTACTGGAAAGCAATGAAGTCTGTGTTATT

 Ty-1^V CTAGATAATGGCCAAGTATCTGGGCGTGTTTTGGTCTATAGAAATCCTGGTCTTCACTTT
 + CTAGATAATGGCCAAGTATCTGGGCGTGTTTTGGTCTATAGAAATCCTGGTCTTCACTTT
 Ty-3 CTAGATAATGGCCAAGTATCTGGGCGTGTTTTGGTCTACAGAAATCCTGGTCTTCACTTT
 Ty-1 CTAGATAATGGCCAAGTATCTGGGCGTGTTTTGGTCTACAGAAATCCTGGTCTTCACTTT

 Ty-1^V GGAGATGTACATGTGATGAAAGCGCGATATGTGGAAGAGCTTGCAGATGTTGTTGGTGAT
 + GGAGATGTACATGTGATGAAAGCGCGATATGTGGAAGAGCTTGCAGATGTTGTTGGTGAT
 Ty-3 GGAGACGTGCATGTGATGAAAGCGCGATATGTGGAAGAGCTTGCAGATGTTGTTGGTGAT
 Ty-1 GGAGATGTGCATGTGATGAAAGCGCGATATGTGGAAGAGCTTGCAGATGTTGTTGGTGAT

 Ty-1^V GCCAAATATGGTATATTTTTTTCAACTAAAGGCCCGAGGTGAGCTGCTACTGAGATTGCA
 + GCCAAATATGGTATATTTTTTTCAACTAAAGGCCCGAGGTGAGCTGCTACTGAGATTGCA
 Ty-3 GCCAAATATGGTATATTTTTTTCAACTAAAGGCCCGAGGTGAGCTGCTACTGAGATTGCA
 Ty-1 GCCAAATATGGTATATTTTTTTCAACTAAAGGCCCGAGGTGAGCTGCTACTGAGATTGCA

 Ty-1^V AATGGTGACTTTGATGGTGATATGTATTGGGTTTCCATAAACCGTAAGTTGGTAGATTCT
 + AATGGTGACTTTGATGGTGATATGTATTGGGTTTCCATAAACCGTAAGTTGGTAGATTCT
 Ty-3 AATGGTGACTTTGATGGTGATATGTATTGGGTTTCCATAAACCGTAAGTTGGTAGATTCT
 Ty-1 AATGGTGACTTTGATGGTGATATGTATTGGGTTTCCATAAACCGTAAGTTGGTAGATTCT

 Ty-1^V TATAACAAGTAGACCATGGATTTCGCATGCATTCAACTCCTAAGGCAGTTAGCAAAAAA
 + TATAACAAGTAGACCATGGATTTCGCATGCATTCAACTCCTAAGGCAGTTAGCAAAAAA
 Ty-3 TATAACAAGTAGACCATGGATTTCGCATGCATTCAACTCCTAAGGCAGTTAGCAAAAAA
 Ty-1 TATAACAAGTAGACCATGGATTTCGCATGCATTCAACTCCTAAGGCAGTTAGCAAAAAA

 Ty-1^V CCAAGTGAATTTTCAGCTGATGAATTGGAATATGAGCTTTTTTAGGCAATTTCTGGAAGCA
 + CCAAGTGAATTTTCAGCTGATGAATTGGAATATGAGCTTTTTTAGGCAATTTCTGGAAGCA

Ty-3 CCAAGTGAATTTTCAGCTGATGAATTGGAATATGAGCTTTTTAGGCAATTTCTGGAAGCA
Ty-1 CCAAGTGAATTTTCAGCTGATGAATTGGAATATGAGCTTTTTAGGCAATTTCTGGAAGCA

Ty-1^V AAGTCTAAAGGTGCCAATATGTCTCTGGCAGCTGATAGCTGGCTGGCATTATGGATCAT
 + AAGTCTAAAGGTGCCAATATGTCTCTGGCAGCTGATAGCTGGCTGGCATTATGGATCAT
Ty-3 AAGTCTAAAGGTGCCAATATGTCTCTGGCAGCTGATAGCTGGCTGGCATTATGGATCAT
Ty-1 AAGTCTAAAGGTGCCAATATGTCTCTGGCAGCTGATAGCTGGCTGGCATTATGGATCAT

Ty-1^V CTTCTGACGCTGCGAGATGATAATGTGGATGATATGCATAGCTTGAAAGGCAAGATGCTT
 + CTTCTGACGCTGCGAGATGATAATGTGGATGATATGCATAGCTTGAAAGGCAAGATGCTT
Ty-3 CTTCTGATGCTGCGAGATGATAATGTGGATGATATGCATAGCTTGAAAGGCAAGATGCTT
Ty-1 CTTCTGATGCTGCGAGATGATAATGTGGATGATATGCATAGCTTGAAAGGCAAGATGCTT

Ty-1^V CACCTGATTGACATCTACTATGATGCATTAGATGCACCTAAAAGCGGGAAGAAGGTTAGC
 + CACCTGATTGACATCTACTATGATGCATTAGATGCACCTAAAAGCGGGAAGAAGGTTAGC
Ty-3 CACCTGATTGACATCTACTATGATGCATTAGATGCACCTAAAAGCGGGAAGAAGGTTAGC
Ty-1 CACCTGATTGACATCTACTATGATGCATTAGATGCACCTAAAAGCGGGAAGAAGGTTAGC

Ty-1^V ATCCCTCATTATCTGAAGGCAAACAAGTTCCCCACTATATGGAAAAAGGGAACCTCTGC
 + ATCCCTCATTATCTGAAGGCAAACAAGTTCCCCACTATATGGAAAAAGGGAACCTCTGC
Ty-3 ATCCCTCATTATCTGAAGGCAAACAAGTTCCCCACTATATGGAAAAAGGGAACCTCTGC
Ty-1 ATCCCTCATTATCTGAAGGCAAACAAGTTCCCCACTATATGGAAAAAGGGAACCTCTGC

Ty-1^V AGCTATCATTCAACTTCTATTCTGGGTGAGATTTATGATCATGTGCGACTCATATCCAGAT
 + AGCTATCATTCAACTTCTATTCTGGGTGAGATTTATGATCATGTGCGACTCATATCCAGAT
Ty-3 AGCTATCATTCAACTTCTATTCTGGGTGAGATTTATGATCATGTGCGACTCATATCCAGAT
Ty-1 AGCTATCATTCAACTTCTATTCTGGGTGAGATTTATGATCATGTGCGACTCATATCCAGAT

Ty-1^V GAAGATTTGTGTATAACAGAAATCTCTAAACTGCCTTGCTTTGAAGTTGAAATCCCTCAA
 + GAAGATTTGTGTATAACAGAAATCTCTAAACTGCCTTGCTTTGAAGTTGAAATCCCTCAA
Ty-3 GAAGATTTGTGTATAACAGAGATCTCTAAACTGCCTTGCTTTGAAGTTGAAATCCCTCAA
Ty-1 GAAGATTTGTGTATAACAGAGATCTCTAAACTGCCTTGCTTTGAAGTTGAAATCCCTCAA

Ty-1^V AGATGCATGACATTGTGGAGAGGAAGATATGAAGAGTACAAAAAGGATATGACACGGGCC
 + AGATGCATGACATTGTGGAGAGGAAGATATGAAGAGTACAAAAAGGATATGACACGGGCC
Ty-3 AGATGCATGACATTGTGGAGAGGAAGATATGAAGAGTACAAAAAGGATATGACACAGGCC
Ty-1 AGATGCATGACATTGTGGAGAGGAAGATATGAAGAGTACAAAAAGGATATGACACAGGCC

Ty-1^V ATGAACTTTGATTGTGAACTAAGAATCACCTCTTGCAATGAAGTTATAAAGAAGTACAAG
 + ATGAACTTTGATTGTGAACTAAGAATCACCTCTTGCAATGAAGTTATAAAGAAGTACAAG
Ty-3 ATGAACTTAGATTGTGAACTTAGAATCACCCCTTGCAATGAAGTTATAAAGAAGTACAAG
Ty-1 ATGAACTTAGATTGTGAACTTAGAATCACCTCTTGCAATGAAGTTATAAAGAAGTACAAG

Ty-1^V ATGTTGCTATATGGTGCTGTGGAGTTTGAACAAACAGTAAGAAAGACTGAAGACATTTTC
 + ATGTTGCTATATGGTGCTGTGGAGTTTGAACAAACAGTAAGAAAGACTGAAGACATTTTC
Ty-3 ATGTTGCTATATGGTGCTGTGGAGTTTGAACAAACAGTAAGAAAGACTGAAGACATTTTC
Ty-1 ATGTTGCTATATGGTGCTGTGGAGTTTGAACAAACAGTAAGAAAGACTGAAGACATTTTC

Ty-1^V GACGAGGCCCTTGCAATATATCATGTAACATATGATAATGCAAGGATCACATACAGCATA
 + GACGAGGCCCTTGCAATATATCATGTAACATATGATAATGCAAGGATCACATACAGCATA
Ty-3 GATGAAGCCCTTGCAATATATCATGTAACATATGATAATGCAAGGATCACATACAGCATA

Ty-1 GATGAAGCCCTTGCAATATATCATGTAACATATGATAATGCAAGGATCACATACAGCATA
 ** ** *****

Ty-1^V GAGAAATGTGGTTTTGCTTGGAAAGTAGCTGGCTCTGCGCTTTGCAGGATCCACGCCATG
 + GAGAAATGTGGTTTTGCTTGGAAAGTAGCTGGTTCTGCGCTTTGCAGGATCCACGCCATG
 Ty-3 GAGAAATGTGGTTTTGCTTGGAAAGTAGCTGGTTCTGCGCTTTGCAGGATCCACGCCATG
 Ty-1 GAGAAATGTGGTTTTGCTTGGAAAGTAGCTGGTTCTGCGCTTTGCAGGATCCACGCCATG

Ty-1^V TATCGCAAGGAAAAAGACTTGCCCATTTTGCATCGGTTTTGCAGGAAATACTCTAG
 + TATCGCAAGGAAAAAGACTTGCCCATTTTGCATCGGTTTTGCAGGAAATACTCTAG
 Ty-3 TATCGCAAGGAAAAAGACTTGCCCATTTTACCATCGGTTTTGCAGGAAATACTCTAG
 Ty-1 TATCGCAAGGAAAAAGACTTGCCCATTTTGCATCGGTTTTGCAGGAAATACTCTAG

טבלה 2. רמת הסימפטומים (DSI) ממוצעת בצמחי F₂ המתפצלים ל- ty-5 ול- Ty-1^V בהשוואה לרמת הסימפטומים של קווי ההורים המקוריים שלהם והמכלוא ביניהם [רמת סימפטומים (DSI) נעה בין 0 ללא סימפטומים) ל- 4 (סימפטומים חמורים) והיא נקבעת ויזואלית, אותיות אנגליות שונות מעל הממוצעים מייצגים הבדלים מובהקים סטטיסטית ברמת מובהקות קטנה מ- 0.05].

ty-5	Ty-1 ^V	N	DSI
R13 = Susceptible line		24	3.2^A±0.2
SS	SS	27	3.2 ^A ±0.2
SR	SS	104	2.7 ^{AB} ±0.1
R13 X TY172 = F₁		9	2.6^{AB}±0.3
SS	SR	70	2.4 ^{BC} ±0.1
SR	SR	187	2.1 ^{CD} ±0.1
SS	RR	43	2.0 ^{CD} ±0.2
SR	RR	82	1.8 ^D ±0.1
RR	SS	43	0.7 ^E ±0.1
RR	SR	103	0.4 ^E ±0.0
RR	RR	59	0.2 ^E ±0.0
TY172 = Resistant line		12	0.0^E±0.0

2. ייצור קווי מיקרו-אינטרוגרסיה באזור הגן ty-5 במטרה לבחון את המשמעות ההורטיקולטורית שלהם

כבר במהלך השנה הראשונה למחקר התברר לנו כי הגן PELOTA הוא הגן המבקר עמידות באתר-5.ty. ככל הידוע בספרות, הגן PELOTA פעיל בתרגום החלבונים בתא בשלב הסופי של מיחזור (recycling) הריבוזומים ובמיוחד כאשר המערכת נמצאת במצב של עקה כמו למשל תחת הדבקה ויראלית. כיוון שמנגנון התרגום הינו מנגנון ביולוגי ברמת היררכיה גבוהה מעניין היה לבחון את התנהגות הצמחים העמידים בהשוואה לצמחים רגישים תוך התמקדות על מרכיבי יכול ללא הדבקה בוירוס (ברור לחלוטין, וכבר הראנו זאת בעבר, כי לצמחים העמידים יתרון ברור תחת הדבקה בוירוס).

כשלב ראשון וכדי לבחון את ביצועי הצמחים העמידים בהשוואה לרגישים שלא תחת תנאי הדבקה ניסוי שדה בדור BC₃F₂ של הכלאות מחזירות לקו הרגיש M-82. הניסוי בוצע בקיץ במבנה של שלושה בלוקים באקראי. התוצאות המוצגות בטבלה 3 מראות על ירידה במרכיבי היבול של בצמחים העמידים בהתאם לחשש שביטאנו לעיל. יחד עם זאת סברנו כי ראוי לציין את הדברים הבאים: 1. ניסוי זה מבטא את השפעתו של ה-PELOTA העמיד ברקע גנטי בודד; 2. התוצאות המוצגות הן מדור BC₃F₂ שייכתן שעדיין אינו איזוגני דיו (הירידה ביבול הנצפית בהטרוזיגוטיים תורמת לסברה זו מאחר והאלל העמיד רצסיבי). 3. מאחר וזרעי עגבניות מסחריים הם זרעי מכלוא, לא נלקחת בחשבון בניסויים מעין אלה התרומה של און מכלוא לביצועי הצמח העמיד.

טבלה 3. מרכיבי יבול של צמחים עמידים ורגישים לא מודבקים מדור BC₃F₂ בהשוואה להורה המחזיר (M-82 = SS) צמחים הומוזיגוטיים ל-PELOTA מהקו הרגיש, SR = צמחים הטרוזיגוטיים, RR = צמחים הומוזיגוטיים ל-PELOTA מהקו העמיד; אותיות שונות מעל לממוצע מציינות הבדל סטטיסטי).

גנוטיפ	משקל פרי לצמח (ק"ג)	מספר פירות לצמח	משקל צמח (גר')
M-82	3.1 ^A ±0.2	52 ^A ±3	511 ^A ±44
SS	2.7 ^A ±0.1	41 ^B ±2	510 ^A ±31
SR	1.9 ^B ±0.1	34 ^{BC} ±2	355 ^B ±31
RR	1.7 ^B ±0.1	33 ^C ±2	413 ^{AB} ±31

על מנת לבחון את השפעת הגן בדור BC מתקדם יותר, בצענו ניסוי דומה, הפעם בדור BC₄F₃. תוצאות הניסוי המוצגות בטבלה 4 מעידות על התמתנות משמעותית של האפקטים השליליים שאנו מיחסים לגן PELOTA. מכן אנו מסיקים כי המשך הכלאות מחזירות עשוי לבטל את ההשפעות השליליות של הגן.

טבלה 4. מרכיבי יבול של צמחים עמידים ורגישים לא מודבקים מדור BC₄F₃ בהשוואה להורה המחזיר (M-82 = SS) צמחים הומוזיגוטיים ל-PELOTA מהקו הרגיש, SR = צמחים הטרוזיגוטיים, RR = צמחים הומוזיגוטיים ל-PELOTA מהקו העמיד; אותיות שונות מעל לממוצע מציינות הבדל סטטיסטי).

גנוטיפ	משקל פרי לצמח (ק"ג)	מספר פירות לצמח	משקל צמח (גר')
M-82	3.1 ^{AB} ±0.1	70 ^A ±3	1381 ^A ±68
SS	3.4 ^A ±0.1	72 ^A ±3	1364 ^A ±60
SR	3.1 ^{AB} ±0.2	74 ^A ±5	1341 ^A ±77
RR	2.6 ^B ±0.2	77 ^A ±5	1433 ^A ±93

3. ניתוח את האפקט הייחודי של *ty-5 chilense* וכן את האפקט המשולב שלו עם *Ty-1*. לפני תחילתו של הפרויקט היה ידוע לנו כי צמחים עמידים הנושאים את הגן *Ty-1* ממקור *S. Chilense* נושאים גם אלל ייחודי של PELOTA, כמודגם באיור 3. חשוב לציין כי אלל זה שונה מזה שזיהינו ב-TY172. במהלך המחקר הדבקנו אוכלוסייה איזוגנית המתפצלת לשני הגנים והתוצאות מוצגות בטבלה 5. מהתוצאות המוצגות בטבלה ניתן להסיק כי בעוד שהאפקט של *Ty-1* שריר וקיים, ל-*ty-5 chilense*

אין אפקט כלשהוא על העמידות לבדו או בשילוב עם *Ty-1*. התוצאות הללו נמצאות בהלימה לשינויים ברצף חומצות האמינו המוצגים באיור 3 כיוון שהם מופיעות הדומיינים השני והשלישי של הגן, שאינם פעילים בשלב מיחזור הריבוזומים של תהליך התרגום.

איור 3. השוואת רצף חומצות האמינו של הגן *PELOTA* ממקור *S. chilense* לבין הרצף מהמין התרבותי *S. lycopersicum* (ההבדלים מוצגים באותיות אדומות).

<i>S. Chilense</i>	MKIVRRDFVPDGSVSKI I PEEADDLWVAYNLI AEGD TVLAVTVRKVLRE
<i>S. lycopersicum</i>	MKIVRRDFVPDGSVSKI I PEEADDLWVAYNLI AEGD TVLAVTVRKVLRE *****
<i>S. Chilense</i>	AASGGRDAERVKLEIKVENVEYDKEGSALRIRGKNI LENEHVKIGAFH
<i>S. lycopersicum</i>	AASGGRDAERVKLEIKVENVEYDKEGSALRIRGKNI LENEHVKIGAFH *****
<i>S. Chilense</i>	TLEIEQHRPFVLRKVVWDSLAREVLRQASDPSASADLAVVLMQEGLAHIL
<i>S. lycopersicum</i>	TLEIEQHRPFVLRKVVWDSLAREVLRQASDPSASADLAVVLMQEGLAHIL *****
<i>S. Chilense</i>	LIGKSVTITRSRIE T S I P R K H G P A I A G Y D K A L N K F F D N V L Q A F V K H V D F K
<i>S. lycopersicum</i>	LIGKSVTITRSRIE S S I P R K H G P A I A G Y D K A L N K F F D N V L Q A F V K H V D F K *****;*****
<i>S. Chilense</i>	VVRCAVIASPGFTKQDFHRHLLLEAERKQLRPI IENKSRI I LVHTTSGYK
<i>S. lycopersicum</i>	VVRCAVIASPGFTKQDFHRHLLLEAERKQLRPI IENKSRI I LVHTTSGYK *****
<i>S. Chilense</i>	HSLKEVMDAPNVMMI K D T K A A K E V Q A L K D F F N M L S N D P D R A C Y G P K H V E
<i>S. lycopersicum</i>	HSLKEVMDAPNVMT I K D T K A A K E V Q A L K D F F N M L S N D P D R A C Y G P K H V E ***** . *****
<i>S. Chilense</i>	VAHERLAIQ I L L I T D D L F R S S D V E T R K K Y A N L V D S V K D S G G T A L I F S S M H
<i>S. lycopersicum</i>	VAHERLAIQ T L L I T D E L F R S S D V E T R K K Y A N L V D S V K D S G G T A L I F S S M H ***** *****;*****
<i>S. Chilense</i>	VSQEQLNQLTGIAAILRFPLPELEDIEM
<i>S. lycopersicum</i>	VSQEQLNQLTGIAAILRFPLPELEDIEM *****

טבלה 5. ממוצעי רמת הסימפטומים של צמחים המתפצלים ל- *Ty-1* ול- *ty-5 chilense* (לכל אחד משני הגנים: $SS =$ צמחים הומויגוטיים לאלל שמקורו מהמין התרבותי, $SR =$ צמחים הטרויגוטיים, ו- $RR =$ צמחים הומויגוטיים ל- *PELOTA* ממין הבר; אותיות שונות מעל לממוצע מציינות הבדל סטטיסטי).

גנוטיפ		
רמת סימפטומים	<i>ty-5 chilense</i>	<i>Ty-1</i>
$3.0^A \pm 0.2$	RR	SS
$2.8^A \pm 0.1$	SR	SS
$2.8^A \pm 0.1$	SS	SS
$1.4^B \pm 0.1$	SR	SR
$1.3^B \pm 0.1$	SS	SR
$1.3^B \pm 0.1$	RR	SR
$1.2^B \pm 0.1$	SR	RR
$1.0^B \pm 0.2$	RR	RR
$1.0^B \pm 0.1$	SS	RR

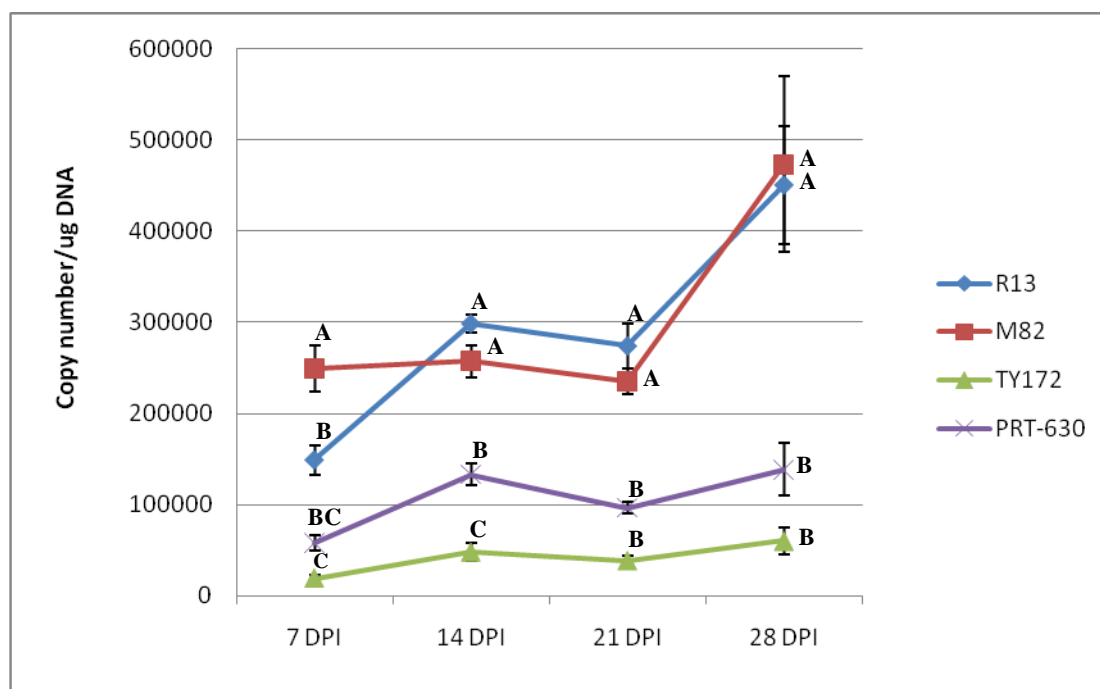
4. לנתח את הרפליקציה של הווירוס בקווי מיקרו-אינטרוגרסיה המכילים את הגן *ty-5* בהשוואה לקו המקורי, TY172, ממנו נלקח הגן.

בוצע ניתוח של כמות הווירוס בקו העמיד PRT-630 מדור BC₂F₄, אשר נושא רק את *ty-5*, בהשוואה ל- TY172 ולשני קווים רגישים (M-82 ו-R13). התוצאות המוצגות באיור 3 מראות כי ברוב מועדים אין הבדל סטטיסטי בין רמת הרפליקציה של הווירוס בקו PRT-630 לבין הקו העמיד המקורי TY172 וכי בשניהם רמת הרפליקציה של הווירוס נמוכה סטטיסטית מהקווים הרגישים.

5. לנתח את הפרופיל התעוקי של הגן *ty-5* וגנים נוספים המצויים בקרבנו, כולל *SINACI*, כדי להבין את מגמות הבקרה התעוקית של הגנום בלוקוס זה.

הפרופיל התעוקי של הגן *ty-5* (*PELOTA*) מוצג בטבלה 1. ניסוי דומה שבוצע על הגן *SINACI* הוביל לתוצאות דומות (לא מוצגות). התוצאות שקבלנו לגבי הגן *SINACI* תואמות תוצאות שקבלנו באוכלוסיות מתפצלות לגן *SINACI* בלבד המראות כי לגן זה אין השפעה כל שהיא על העמידות (Lapidot et al., 2015).

איור 3. הצטברות הדנ"א של ווירוס צהבון האמיר של העבנייה (TYLCV) בקודקודי צמיחה של צמחים נגועים בקווים: M82, R13, PRT-630, TY172 במספר מועדים מרגע ההדבקה.



מסקנות והשלכותיהן על ביצוע המחקר

1. פענוח זהות הגן המבקר עמידות לוורוס צהבון האמיר בלוקוס *ty-5*

פענוח הגן המוביל לעמידות לוורוס צהבון האמיר בלוקוס *ty-5* מהווה עבורנו פריצת דרך מכמה היבטים: פותח סמן המאפשר אפיון גנטי בשלב הנבט ונפתחו אפשרויות חדשות ומדייקות ליצירת שילובים גנטיים חדשים עם גנים אחרים המבקרים עמידות לוורוס. כ"כ, פענוח זהות הגן מאפשר לנו לבצע ניסויים יותר ממוקדים. זיהוי הלוקוס הנוסף המבקר עמידות לוורוס בקו TY172 והתוצאות שהוצגו בדו"ח זה מובילות אותנו לחשוב כי שני הגנים הללו תורמים למרב העמידות אשר מאפיינת את הקו הזה. כפי שהוצג – שילוב של שני הגנים מוריד את הסימפטומים לרמה שאינה שונה באורח מובהק מ-0 (היעדר סימפטומים).

2. פיתוח חמר גנטי של עגבניות עמידות לוורוס

קווי ההורים אשר פיתחנו, במיוחד אלו מהדורות המתקדמים ביותר, יכולים כבר לשמש כקווי הורים בהכלאות כדי לייצור זני מכלוא ניסיוניים לבחינה.

פרוט מלא של הפרסומים המדעיים

Lapidot, M., Levin, I., and Reuveni, M. 2012.

An isolated nucleotide sequence responsible for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* disease at the tomato *Ty-5* locus and uses thereof.

US patent application 61/704,500

Fogel, D. 2013.

Identification of the gene controlling TYLCV resistance at the *ty-5* locus and its characterization using transgenic lines.

Master of Science Submitted to the Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment of the Hebrew University of Jerusalem.

Levin, I., Reuveni, M., Evenor, D., Gelbart, D., Chen, L., Nahon, S., Shlomo, H., Machbash, Z., and Lapidot, M. 2013.

Cloning and analysis of the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance gene *Ty-5*. *Tomato Breeders Round Table, Chiang Mai, Thailand* (P14).

Hutton, S.F., Scott, J.W., Shekasteband, R., Levin, I. and Lapidot, M. 2015.

Combinations of *Ty* resistance genes generally provide more effective control against begomoviruses than do single genes.

Acta Hort. 1069:59-64.

Reuveni, M., Debbi, A., Kutsher, Y., Zemach, H., Belausov, E., Gelbart, D., Levin, I., and Lapidot, M. 2015.

Tomato yellow leaf curl virus effects on chloroplast biogenesis and cellular structure.

Physiol. and Mol. Plant Pathol. 92: 51-58.

Lapidot, M., Karniel, U., Gelbart, D., Fogel, D., Evenor, D., Kutsher, Y., Makhbash, Z., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Reuveni, M., and Levin, I. 2015.

A novel route controlling begomovirus resistance by the messenger RNA surveillance factor Pelota.

Plos Genet., 11(10):e1005538. doi: 10.1371/journal.pgen.1005538.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתכנית העבודה: 1. מיפוי עדין ופונקציונאלי של הגן המבקר את העמידות לוורוס צהבון האמיר בלוקוס *ty-5*; **2.** ייצור קווי מיקרו-אינטרוגרסיה באזור הגן *ty-5* במטרה לבחון את המשמעות ההורטיקולטורית שלהם; **3.** לנתח את האפקט הייחודי של *ty-5 chilense* וכן את האפקט המשולב שלו עם *Ty-1*; **4.** לנתח את הרפליקציה של הוורוס בקווי מיקרו-אינטרוגרסיה המכילים את הגן *ty-5* בהשוואה לקו המקורי, *TY172*, ממנו נלקח הגן; **5.** לנתח את הפרופיל התעוקי של הגן *ty-5* וגנים נוספים המצויים בקרבנו, כולל *SINACI*, במטרה להבין את מגמות הבקרה התעוקית של הגנום בלוקוס זה.

עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח: 1. פוענח הגן המוביל לעמידות לוורוס צהבון האמיר בעגבניה; **2.** הלוקוס *ty-5*, כפי שנבחן בדור BC_3F_2 , נושא עמו אפקטים שליליים על מרכיבי יבול. אולם אפקטים אלו התמתנו משמעותית בדור BC_4F_3 ; **3.** ל-*ty-5 chilense* אין אפקט ייחודי בהקניית עמידות לוורוס צהבון האמיר וכן אינו מצוי באינטראקציה עם *Ty-1*; **4.** הרפליקציה של וורוס צהבון האמיר בקווי מיקרו-אינטרוגרסיה המכילים את הגן *ty-5* מעוכבת במידה רבה וברב המקרים אינה שונה באופן סטטיסטי מ-*TY172*; **5.** הגן *ty-5 (PELOTA)* וכן הגן *SINACI* אינם מבוקרים תעוקית הן בצמחים מודבקים והן בצמחים שאינם מודבקים; **6.** זיהוי לוקוס נוסף המבקר את העמידות לוורוס בקו *TY172* אשר יחד עם *ty-5* תורם משמעותית לפחיתה ברמת הסימפטומים בקו זה.

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו: פענוח זהות הגן, המבקר עמידות לוורוס צהבון האמיר בלוקוס *ty-5* של העגבניה, מאפשר פיתוח סמן מדייק להחדרת הגן לקווי סלקציה ושילובו עם גנים אחרים. גן זה הוא השני מסוגו בעולם שמיחוס לעמידות של וורוס צהבון האמיר וזהותו מאפשרת בירור המנגנונים הביולוגיים באמצעותם מתמודד הצמח עם נגע זה. זיהוי אתר גנטי נוסף המבקר עמידות לוורוס בקו *TY172* מצריך עבודה נוספת על מנת לברר את זהותו.

הבעיות שנתרו לפיתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה: לא חלו שינויים מהותיים במהלך העבודה.

הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח (פרסומים בכתב):

Lapidot, M., Levin, I., and Reuveni, M. 2012.

An isolated nucleotide sequence responsible for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* disease at the tomato *Ty-5* locus and uses thereof.

US patent application 61/704,500

Fogel, D. 2013.

Identification of the gene controlling TYLCV resistance at the *ty-5* locus and its characterization using transgenic lines.

Master of Science Submitted to the Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment of the Hebrew University of Jerusalem.

Levin, I., Reuveni, M., Evenor, D., Gelbart, D., Chen, L., Nahon, S., Shlomo, H., Machbash, Z., and Lapidot, M. 2013.

Cloning and analysis of the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance gene *Ty-5*.

Tomato Breeders Round Table, Chiang Mai, Thailand (P14).

- Hutton, S.F., Scott, J.W., Shekasteband, R., Levin, I. and Lapidot, M. 2015.
Combinations of *Ty* resistance genes generally provide more effective control against begomoviruses than do single genes.
Acta Hort. 1069:59-64.
- Reuveni, M., Debbi, A., Kutsher, Y., Zemach, H., Belausov, E., Gelbart, D., Levin I., and Lapidot, M. 2015.
Tomato yellow leaf curl virus effects on chloroplast biogenesis and cellular structure.
Physiol. and Mol. Plant Pathol. 92: 51-58.
- Lapidot, M., Karniel, U., Gelbart, D., Fogel, D., Evenor, D., Kutsher, Y., Makhbash, Z., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Reuveni, M., and Levin, I. 2015.
A novel route controlling begomovirus resistance by the messenger RNA surveillance factor Pelota.
Plos Genet., 11(10):e1005538. doi: 10.1371/journal.pgen.1005538.

פרסום הדו"ח:

אני ממליץ לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט).