VNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE BiOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

CARACTERIZACIÓN DE VN VIRUS QUE INFECTA AL HONGO
ENDÓFITICO EPICHLÖE FESTIVCAE

MARÍA ROMO VAQUERO

2010

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

CARACTERIZACIÓN DE UN VIRUS QUE INFECTA AL
HONGO ENDOFÍTICO *Epichloë festucae*

Memoria que presenta la
Licenciada en Biología
María Romo Vaquero
para optar al grado de
Doctor por la Universidad
de Salamanca

Salamanca, Octubre de 2010

*"PRIMERO TE IGNORAN, DESPUÉS SE RÍEN DE TI,
LUEGO TE ATACAN, ENTÓNCEZ GANAS"*
MAHATMA GANDHI.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la autora durante seis años, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Iñigo Zabalgogeaazcoa González, director de esta Tesis Doctoral, por darme la oportunidad de llevarla a cabo , así como por sus sugerencias sin las cuales no hubiera sido posible la elaboración de este trabajo.

Igualmente quisiera agradecer a todo el Departamento de Pastos del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca su cooperación en la realización de esta tesis doctoral. Agradecer también al Dr Balbino García Criado y la Dr. M^a Antonia García Ciudad su apoyo en el logro de la beca de tres años, con la cual se financió ésta tesis.

De igual forma, quiero mencionar la valiosísima ayuda desinteresada de la Dr. Rosa Esteban, cuya orientación fue clave para la consecución de resultados favorables.

Especialmente, también quisiera dar mi más sincero agradecimiento a D. José Matías Hernández Sánchez, por su colaboración y aliento así como por su implicación personal en todo momento.

Agradecer a la Dra. María Teresa García Conesa, que me brindara la oportunidad de seguir disfrutando de la investigación, pudiendo compaginar mi trabajo en Murcia con la finalización de esta tesis doctoral, así como el apoyo de todos los compañeros del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura.

Por último, me gustaría resaltar la comprensión, la paciencia y el cariño de mi familia. A mis padres que siempre me enseñaron la honestidad y la perseverancia en el trabajo, les doy las gracias por sus esfuerzos. A mi padre, que desde donde esté nunca dejó de estar a mi lado. A mi madre por la eterna confianza que siempre depositó en mí y por compartir todas mis penas y alegrías. A mi hermano Julián y su esposa Almudena, que siempre me alentaron y me supieron ayudar. A mis tíos que siempre me desearon lo mejor.

No menos importantes son todos aquellos amigos: Carlos, Manolo, Cristina, Virginia, Teresa, Sandra, María, Marta, Carolina, Jesús, Yolanda, Carmen, Eva, Lorena, Paula, María, Abigail, Patricia, Luis, Roberto, Manuel, José Antonio, Mar, Pepa, María, Pilar, Macarena, Natali, Devora, Laura, Luna, Alicia, Victoria, Choni, Ana, David, Paco, Juan, LLoao, Santiago, Fernando, Juan Carlos y Pedro, que no desfallecieron en sus ánimos, cariño y apoyo.

Doy gracias a Dios por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente.

Índice

Introducción	11
I. Los hongos endófitos	11
II. Los hongos endófitos de gramíneas	12
III. Los endofitos sistémicos de gramíneas: <i>Neotyphodium</i> y <i>Epichloë</i> spp.	13
• Taxonomía	15
• Ciclos de vida	16
• Mutualismo en las interacciones entre endofitos sistémicos y gramíneas	20
IV. <i>Epichloë festucae</i>	22
V. Los Virus	23
VI. Origen de los virus de RNA	24
VII. Los micovirus	26
• Características de los micovirus	26
• Diversidad y clasificación en micovirus	27
• Efectos producidos por infecciones micovíricas	29
VIII. Los micovirus de <i>Epichloë festucae</i>	31
IX. Bibliografía	32
Objetivos	39
I. Objetivo general	39
II. Objetivos específicos	39
Capítulo 1: Incidencia de RNAbc en poblaciones de <i>E. festucae</i>	41
I. Introducción	41
II. Materiales y métodos	43
• Recolección de plantas y aislamiento de <i>E. festucae</i>	43
• Extracción de RNAbc	45
III. Resultados y discusión	46
• Incidencia de RNAbc en aislados de <i>E. festucae</i>	47
IV. Conclusiones	51

V. Bibliografía.....	52
Capítulo 2: Mecanismos de transmisión y persistencia de los virus de <i>Epichloë festucae</i>	55
I. Introducción	55
• Transmisión por anastomosis	55
• Transmisión a esporas sexuales y asexuales	56
II. Materiales y métodos	58
• Análisis de la transmisión por medio de esporas asexuales.....	58
• Transmisión por medio de esporas sexuales.....	59
• Relación entre la distancia genética y la presencia de virus en aislados de <i>Epichloë festucae</i>	60
III. Resultados y discusión	60
• Transmisión vertical por esporas asexuales	60
• Transmisión por esporas sexuales	61
• Persistencia de RNAbc en aislados de <i>E. festucae</i>	62
IV. Conclusiones	64
V. Bibliografía.....	65
Capítulo 3: Efectos fenotípicos de la infección de EfV1 y EfV2 ..	69
I. Introducción	69
II. Materiales y métodos	71
• Crecimiento radial.....	71
• Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de <i>Epichloë festucae</i>	72
• Efecto de la temperatura en la concentración celular de RNAbc.....	72
III. Resultados y discusión	73
• Efecto de la presencia de virus en el crecimiento de aislados	73
• Efecto de la temperatura de incubación en la concentración celular de virus	80
• Efecto de la temperatura de incubación en la biomasa	82
IV. Conclusiones	85
V. Bibliografía.....	86

Capítulo 4: Caracterización molecular de EfV1	89
I. Introducción	89
• Posible estructura del genoma de EfV1	89
• Adscripción filogenética de EfV1	92
II. Materiales y métodos	95
Extracción de RNAbc, clonación y secuenciación	95
Análisis del genoma de EfV1	99
1. Búsqueda de ORFs en EfV1	99
2. Análisis estructural de regiones UTR y zona de unión de los dos ORFs de EfV1	99
3. Estudio estructural de las proteínas codificadas por el ORF1 y ORF2 en EfV1 por medio de técnicas bioinformáticas	100
• Estructura primaria. Propiedades de los residuos	100
• Estructura Secundaria de las proteínas de EfV1	101
• Estudio de la estructura terciaria de las proteínas de EfV1	103
Análisis filogenético	105
III. Resultados y discusión	106
Clonación	106
Organización del genoma de EfV1	108
Análisis de los ORFs del genoma de EfV1	113
1. ORF1	113
• Características del gen	113
• Estructura primaria de la posible proteína codificada por el ORF1	114
• Función y homología de la posible proteína codificada por el ORF1	115
• Dominios conservados en el producto de ORF1	118
• Estructura secundaria del ORF1 de EfV1	119
• Estructura terciaria del ORF1 de EfV1	122
2. ORF2	123
• Características del gen	123
• Características de la estructura primaria de la posible proteína codificada por ORF2	123

• Función y homología de la posible proteína codificada por el ORF2 ...	124
• Dominios conservados en la RdRp.....	126
• Estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos del ORF2 de EfV1.....	135
• Estructura terciaria de la secuencia de aminoácidos del ORF2 de EfV1141	
Estructura de las de regiones no traducidas del genoma de EfV1.....	143
1. UTR5'	143
2. UTR3'	144
Análisis de la zona de solapamiento entre ORF1 y ORF2	145
3. Estructura secundaria de la zona de solapamiento entre ORFs.....	148
Adscripción filogenética de EfV1.....	151
IV. Conclusiones	160
V. Bibliografía.....	161
Apéndice I.....	169
Apéndice II: Evaluación del proceso de síntesis de cDNA.....	170
I. Introducción	170
¿Por que es difícil el proceso de obtención de cDNA?	170
II. Materiales y métodos	171
• Punto Crítico 1.....	172
• Punto Crítico 2.....	172
• Punto Crítico 3.....	174
• Punto Crítico 4.....	174
• Punto Crítico 5.....	175
III. Resultados y discusión.....	176
IV. Bibliografía.....	180
Apéndice III.....	181
• Codones empleados en la traducción de cada aminoácido de ORF1.....	181
• Hidrofobicidad en la secuencia de aminoácidos del ORF1.....	182
• Codones empleados en la traducción de cada aminoácido para el ORF2184	
• Hidrofobicidad en la secuencia de aminoácidos del ORF2	185

• cDNAs similares a EfV-1	186
Apéndice IV	187
I. Alineamientos realizados con el programa ClustalX con las secuencias pertenecientes a la cápsida, de los miembros de la familia <i>Totiviridae</i>	187
II. Alineamientos realizados con el programa ClustalX con las secuencias pertenecientes a la polimerasa completa, de los miembros de la familia <i>Totiviridae</i>	194
I. Alineamientos realizados con el programa ClustalX con las secuencias pertenecientes a los motivos conservados de la polimerasa, de los miembros de la familia <i>Totiviridae</i>	201

Introducción

I. Los hongos endófitos

Los endófitos son un grupo de hongos que durante todo o gran parte de su ciclo de vida infectan los tejidos internos de plantas sin causar síntomas. Durante las últimas dos décadas se han realizado censos de la presencia de hongos endófitos en numerosas especies de plantas y los resultados de estos estudios indican que este tipo de hongos es ubicuo y que todas las especies vegetales son hospedadoras de endófitos (Stone et al., 2004, Schulz y Boyle, 2005, Arnold, 2007, Hyde y Soyong, 2008).

En general, son numerosas las especies endófitas asociadas a cada especie vegetal, en varios casos se han identificado decenas e incluso cientos de especies endofíticas asociadas a una sola especie vegetal, lo que indica que la micobiota endofítica representa un conjunto de una gran diversidad biológica, aunque la mayoría de las especies endófitas pertenecen a la división Ascomycota (Stone et al., 2004; Sánchez Márquez et al., 2007, 2008; Rodriguez et al., 2009). Se conocen endófitos especializados en una sola especie hospedadora (ej. algunas especies de *Epichloë* y *Neotyphodium*) mientras que otros son generalistas capaces de infectar múltiples especies vegetales (ej. *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* spp.). En lo que respecta al tipo de colonización, hay especies endofíticas exclusivas de un tipo de tejido, mientras que otras pueden infectar diversos órganos de la planta. La mayoría de las especies endofíticas conocidas parecen estar localmente restringidas a la colonización de una pequeña zona de las plantas, solo se conocen unas pocas especies endofíticas, pertenecientes a los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium* que colonizan sistémicamente la parte aérea de las plantas infectadas.

Por definición se considera endófito a un hongo que no induce síntomas obvios en las plantas hospedadoras y debido a esta característica en la mayoría de los casos se desconoce que efectos tiene un determinado tipo de infección endofítica en una planta. No obstante, se conocen algunas especies beneficiosas para sus plantas huéspedes, en estos casos se ha observado una mejora de la adaptación de plantas infectadas a condiciones subóptimas debidas a factores de estrés biótico o abiótico (patógenos, herbívoros, alta temperatura, salinidad, suelos pobres en nutrientes) (Schardl et al., 2004; Zabalgogezcoa, 2008; Rodríguez et al., 2009). Debido al mutualismo observado en algunas asociaciones planta-endófito, Rodríguez y Redman (2008) han postulado que los hongos endófitos podrían jugar un papel importante en la adaptación de las plantas a nuevos ambientes y ecosistemas.

En la actualidad la investigación sobre hongos endófitos está experimentando un auge, esto se debe tanto a su interés puramente científico, ya sea como organismos comunes en plantas y capaces de alterar sus respuestas cotidianas, o bien por aspectos más aplicados como su potencial para la mejora de cultivos o como fuente de productos de interés farmacológico (Strobel, 2002).

II. Los hongos endófitos de gramíneas

Las gramíneas son plantas que han tenido un papel muy importante en la historia de la investigación sobre hongos endófitos. Las primeras publicaciones sobre endófitos fueron descripciones de la presencia de hifas en el interior de semillas de cizaña (*Lolium temulentum*), una gramínea conocida desde la antigüedad como una mala hierba en cultivos de cereales y por su toxicidad (Vogl, 1898; Guerin, 1898; Freeman 1902). En las décadas posteriores a la publicación de estos trabajos pioneros el tema no recibió mucha atención hasta 1977, cuando se publicó un estudio que contribuiría a estimular el interés científico en los endófitos. En ese trabajo Charles Bacon y colaboradores demostraron que la

festucosis, un síndrome tóxico relativamente común en ganado vacuno alimentado en pastos de *Festuca arundinacea*, estaba relacionado con el consumo de plantas aparentemente asintomáticas, pero cuyas hojas, tallos y semillas estaban colonizados intercelularmente por un hongo que identificaron como *Epichloë typhina* (Bacon et al., 1977). Unos años más tarde un síndrome tóxico similar en ovejas alimentadas en pastos de *Lolium perenne* en Nueva Zelanda también fue atribuido a un hongo endófito de características similares al de *Festuca arundinacea* (Fletcher y Harvey, 1981). Posteriormente se descubriría la presencia de diversos alcaloides tóxicos en plantas infectadas por esos hongos y que las plantas infectadas poseen en muchas circunstancias mejor rendimiento agronómico que las plantas libres de infección (Schardl et al., 2004; Kuldau y Bacon, 2008). Desde que se realizaron estos descubrimientos, la investigación sobre endófitos pertenecientes a los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium* ha experimentado un auge que también ha impulsado la investigación sobre endófitos en plantas de otras familias (Hyde y Soyong, 2008).

Aunque en la actualidad se conocen varios cientos de especies endofíticas en gramíneas (Sánchez Márquez et al., 2007; 2008), *Neotyphodium* y sus teleomorfos *Epichloë* son los géneros de endófitos que más atención han recibido y posiblemente los mejor conocidos. Esta tesis doctoral está relacionada con *Epichloë festucae*, una especie de este grupo.

III. Los endófitos sistémicos de gramíneas: *Neotyphodium* y *Epichloë* spp

El género *Neotyphodium* abarca especies estrictamente asexuales de *Epichloë*, el origen de algunas especies de *Neotyphodium* está en hibridaciones interespecíficas entre especies de *Epichloë* (Schardl et al., 1994). Las especies de ambos géneros colonizan sistémicamente el espacio intercelular de hojas y tallos (Figura 1), y todas las especies de *Neotyphodium* y varias de *Epichloë* se

transmiten eficientemente a la mayoría de las semillas producidas por una planta infectada (Figura 2). Las estructuras reproductivas asexuales, conidios y conidioforos poseen mucha similitud morfológica en ambos géneros (Figura 3). Las especies de *Epichloë* y *Neotyphodium* muestran especificidad hacia sus huéspedes, y cada especie suele infectar solo una o unas pocas especies de gramíneas (Tablas 1 y 2).

Figura 1. Micelio intercelular de *Epichloë* en la vaina foliar (A) y en hoja (B) de una planta huésped. C) Micrografía electrónica de barrido mostrando hifas en el espacio intercelular de tejidos de la vaina foliar.

Figura 2. Hifa de *Neotyphodium coenophialum* en la capa de aleurona de una semilla de *Festuca arundinacea*

Figura 3. Morfología del conidio y conidióforo de *Epichloë festucae*. El conidio tiene forma ovalada, una longitud de aproximadamente 5 μm y está sujeto por un conidióforo simple.

Taxonomía

En la actualidad se conocen 11 especies del género *Epichloë* y 16 de *Neotyphodium* (Tablas 1 y 2). Estos géneros pertenecen a la familia *Clavicipitaceae* (División *Ascomycota*) y como sucede en otras especies de esta familia (ej. *Claviceps purpurea*) la mayoría de las especies de *Neotyphodium* y *Epichloë* producen varios alcaloides tóxicos. Estos alcaloides se acumulan en las plantas y son el motivo por el cual el consumo de una cantidad suficiente de plantas infectadas puede causar intoxicaciones al ganado vacuno, ovino o equino produciendo toxicosis (Schardl et al., 2004).

Tabla 1. Especies de endófitos del género *Neotyphodium* y sus gramíneas hospedadoras (Kuldau y Bacon, 2008).

Especie	Especies hospedadoras
<i>Neotyphodium aotearoae</i>	<i>Echinopogon ovatus</i>
<i>N. australense</i>	<i>Echinopogon ovatus</i>
<i>N. chisosum</i>	<i>Achnatherum eminens</i>
<i>N. coenophialum</i>	<i>Festuca arundinacea</i>
<i>N. huerfanum</i>	<i>F. paradoxa</i> , <i>F. arizonica</i>
<i>N. gansuense</i>	<i>Achnatherum inebrians</i>
<i>N. inebrians</i>	<i>Achnatherum inebrians</i>
<i>N. occultans</i>	<i>Lolium multiflorum</i> , <i>L. canariense</i> , <i>L. persicum</i> , <i>L. remotum</i> , <i>L. rigidum</i> , <i>L. subulatum</i> , <i>L. temulentum</i>
<i>N. lolii</i>	<i>Lolium perenne</i>
<i>N. melicicola</i>	<i>Melica decumbens</i>
<i>N. siegelii</i>	<i>Lolium Pratense</i> , <i>E. festucae</i> ,
<i>N. starrii</i>	<i>Festuca subulata</i> , <i>F. arizonica</i> , <i>Bromus anomalus</i>
<i>N. tembladerae</i>	<i>Poa huecu</i> , <i>Festuca argentina</i> , <i>F. hieronymi</i> , <i>F. arizonica</i>
<i>N. typhinum</i>	<i>Poa sylvestris</i>
<i>N. typhinum</i> var. <i>Canariense</i>	<i>Lolium edwardii</i>
<i>N. uncinatum</i>	<i>Lolium pratense</i>

Tabla 2. Especies de endófitos del género *Epichloë* y sus gramíneas hospedadoras (Kuldau y Bacon, 2008).

Especies del género <i>Epichloë</i>	Especies hospedadoras
<i>E. amarillans</i>	<i>Agrostis hiemalis</i> , <i>Calamagrostis villosa</i> , <i>Sphenopholis obtusata</i>
<i>E. baconii</i>	<i>Agrostis stolonifera</i> , <i>A. tenuis</i> , <i>Calamagrostis villosa</i>
<i>E. brachyelytri</i>	<i>Brachyelytrum erectum</i>
<i>E. bromicola</i>	<i>Bromus erectus</i> , <i>B. ramosus</i> , <i>Hordelymus</i> <i>sp.</i>
<i>E. clarkii</i>	<i>Holcus lanatus</i>
<i>E. elymi</i>	<i>Elymus canadensis</i> , <i>E. hystrix</i> , <i>E.</i> <i>villosus</i> , <i>E. virginicus</i>
<i>E. festucae</i>	<i>Festuca rubra</i> , <i>F. gigantea</i> , <i>F. longifolia</i> , <i>Koeleria sp.</i>
<i>E. glyceriae</i>	<i>Glyceria striata</i>
<i>E. sylvatica</i>	<i>Brachypodium sylvaticum</i>
<i>E. typhina</i>	<i>Anthoxanthum odoratum</i> , <i>Arrhenatherum</i> <i>sp.</i> , <i>Brachypodium pinnatum</i> , <i>Brachypodium phoenicoides</i> , <i>Dactylis</i> <i>glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum</i> <i>pratense</i> , <i>Poa nemoralis</i> , <i>Poa trivialis</i> , <i>Poa</i> <i>pratensis</i> , <i>Poa silvicola</i> , <i>Puccinellia sp.</i>
<i>E. yangzii</i>	<i>Roegneria kamoji</i>

Ciclos de vida

Los mecanismos de transmisión de los endófitos *Epichloë* dependen de dos tipos de reproducción: sexual, caracterizada por un modo de transmisión horizontal, y asexual, caracterizada por la transmisión vertical del endofito de una planta infectada a su descendencia (Figura 6).

La **transmisión vertical** sucede cuando las semillas de una planta infectada son infectadas y como resultado germinarán produciendo una nueva generación de plantas infectadas. En este tipo de transmisión la reproducción del hongo es clonal y asexual. Es un mecanismo de transmisión muy eficiente, ya que la mayoría de las semillas producidas por una planta infectada están infectadas por el mismo

genotipo de hongo que infecta a la planta madre. La infección de semillas sucede cuando durante el desarrollo de la inflorescencia el hongo que infecta a la planta madre penetra en los óvulos, una vez desarrollada la semilla se encuentra en partes del embrión y en la capa de aleurona de las semillas (Figura 2). Este tipo de transmisión sucede en todas las especies de *Neotyphodium* y en varias especies de *Epichloë*. Cuando los endófitos sistémicos se transmiten por semilla las plantas infectadas no muestran ningún síntoma de enfermedad.

La **transmisión horizontal** requiere la reproducción sexual del hongo, ya que en este caso los propágulos infecciosos son esporas sexuales, ascosporas. La reproducción sexual de las especies de *Epichloë* está relacionada con la formación de estromas en tallos reproductivos de las plantas infectadas (Figuras 4 y 5). Estos estromas impiden la emergencia de la espiga y esterilizan el tallo afectado, por lo tanto, cuando *Epichloë* se reproduce sexualmente la infección produce síntomas en las plantas, aunque solo durante su fase reproductiva, estos síntomas se conocen como la enfermedad del estrangulamiento de las gramíneas. Una vez que el hongo que infecta a una planta produce un estroma en un tallo reproductivo, el estroma puede ser fertilizado por conidios de otro genotipo compatible ya que *Epichloë* es un género heterotálico. Los conidios son transportados al estroma desde otro estroma por aire o por insectos que depositan huevos y se alimentan de estromas, como las moscas del género *Phorbia*. Tras la fertilización el estroma desarrolla peritecios con ascosporas y su color adquiere un tono naranja. (Schardl *et al.*, 2004).

Figura 4. A) Estromas esterilizando tallos reproductivos de *Brachypodium phoenicoides* junto a una espiga sana.. B) Aspecto de un tallo de *Festuca rubra* en el que se ha formado un estroma fúngico que impide el desarrollo de la espiga.

En algunas especies de *Epichloë* y en todas las del género asexual *Neotyphodium*, la reproducción sexual es rara o inexistente; en estos casos las plantas infectadas no muestran síntomas (estromas) y el hongo se transmite verticalmente por medio de la infección de casi la totalidad de las semillas producidas por una planta infectada (Figura 6).

Figura 5. a. Dibujo de un estroma maduro alrededor de un tallo en el que se observan los peritecios asentados sobre la superficie del estroma. b. Sección longitudinal de un estroma con peritecios y ascas. c. Asca con ascosporas. d. ascospora madura. e. Ápice superior de las ascas. (Ellis and Ellis, 1985).

Figura 6. Esquema del ciclo sexual y asexual de *Epichloë festucae* en *Festuca rubra*: En el ciclo asexual del simbiote se produce la infección de semillas en la planta madre, de forma que el hongo se transmitirá verticalmente a la próxima generación del hospedador. El ciclo sexual es iniciado por el desarrollo de un estroma que envuelve a un tallo inmaduro impidiendo la emergencia de la inflorescencia. Después de la fertilización y la maduración de los peritecios en el estroma, las ascosporas son expulsadas y infectan a un nuevo hospedador alcanzando el óvulo a través de la flor.

Según las características de su ciclo de vida y los mecanismos predominantes de transmisión, las interacciones de las especies de *Epichloë* y *Neotyphodium* con plantas han sido clasificadas en tres tipos (Sampson, 1933; White, 1988):

Interacciones sintomáticas tipo I. Desarrollo de estromas en todos o casi todos los tallos reproductivos y por lo tanto esterilización total o casi total de la planta hospedadora. Los órganos vegetativos de la planta están sistémicamente infectados pero no muestran síntomas, cuando la planta entra en estado reproductivo es cuando el hongo produce estromas alrededor del tallo de la

espiga, impidiendo la emergencia de las inflorescencias. Las asociaciones de *Epichloë typhina* con *Brachypodium phoenicoides*, o de *Epichloë clarkii* con *Holcus lanatus* son de este tipo. Estas especies no se transmiten verticalmente por semilla y su reproducción es estrictamente sexual, son patógenas y causantes de la enfermedad del estrangulamiento en gramíneas.

Interacciones mixtas tipo II. El desarrollo de estromas es muy raro, si sucede es solo en uno o en unos pocos tallos reproductivos de la planta infectada. La frecuencia de plantas con síntomas suele ser menor del 1%. Los tallos reproductivos asintomáticos están colonizados por hifas de *Epichloë*, que infectan los óvulos y se transmiten verticalmente por semilla. La reproducción del hongo en este tipo de asociaciones puede ser sexual (ascoesporas liberadas de estromas) o asexual (transmisión vertical por semilla). La tasa de transmisión por semilla es muy elevada, cercana al 100%. Un ejemplo de este tipo de interacciones es la asociación de *Epichloë festucae* con *Festuca rubra*.

Interacciones asintomáticas tipo III. Nunca aparecen estromas en los tallos reproductivos. Estas interacciones las realizan especies estrictamente asexuales que se transmiten exclusivamente por semilla. Todas las especies de *Neotyphodium* pertenecen a esta categoría.

Mutualismo en las interacciones entre endofitos sistémicos y gramíneas

Los endofitos de tipo II y III raramente o nunca inducen síntomas en plantas infectadas, ya que su mecanismo de transmisión predominante es vertical. En las interacciones de este tipo, el hongo se beneficia al obtener de las plantas un nicho ecológico con nutrientes y un medio de propagación y dispersión, la

transmisión por semilla. A cambio, las plantas huéspedes obtienen beneficios como un aumento de la resistencia a mamíferos, insectos y nematodos herbívoros (West *et al.*, 1988; Paterson *et al.*, 1995; Bazely *et al.*, 1997; Kuldau y Bacon, 2008). Esta resistencia parece estar mediada principalmente por alcaloides de diversos tipos producidos por el hongo en las plantas infectadas (Schardl *et al.*, 2004), aunque en el caso de la resistencia a nematodos otros factores podrían estar implicados (Zabalgogezcoa, 2008). Los alcaloides ergotamínicos, las lolinas y los lolitrenos son tóxicos para mamíferos, mientras que la peramina no es tóxica para mamíferos pero sí para insectos. Exceptuando algunas especies de tipo I, las demás especies de *Epichloë* y *Neotyphodium* producen alcaloides de estas clases, aunque el conjunto de alcaloides producido varía dependiendo de la especie fúngica y de su genotipo (Vázquez de Aldana *et al.*, 2009). Además de ventajas frente a herbívoros, las plantas infectadas por *Epichloë* también muestran un aumento de la resistencia a algunas especies de hongos patógenos (Zabalgogezcoa, 2008); así como un aumento de la tolerancia a factores de estrés abiótico tales como sequía, suelos pobres en nutrientes, o concentraciones tóxicas de algunos nutrientes (Malinowski y Belesky, 2000; Zaurov *et al.*, 2001; Zabalgogezcoa *et al.*, 2006a).

La naturaleza mutualista de las interacciones entre endofitos sistémicos y gramíneas ha sido uno de los motivos que más han contribuido a despertar el interés científico e industrial en este tipo de asociaciones. Las ventajas adaptativas obtenidas por las plantas y el hecho de que una vez infectada una planta las semillas que esta produce estarán infectadas por el mismo genotipo de endofito indican la utilidad de los endofitos para la mejora de cultivos. En la actualidad hay disponibles en el mercado diversas variedades de gramíneas para céspedes infectadas por endofitos, así como variedades forrajeras de *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne* infectadas por variedades de *Neotyphodium*

defectivas en la producción de alcaloides tóxicos para mamíferos (Brilman, 2005; Kuldau y Bacon, 2008).

IV. *Epichloë festucae*

Dentro del conjunto de las especies endofíticas sistémicas de gramíneas, las más estudiadas han sido *Neotyphodium coenophialum* y *Epichloë festucae*, el genoma de *E. festucae* ha sido secuenciado recientemente (<http://csurs.csr.uky.edu/biodb-testbed/>). *E. festucae* infecta a varias especies de *Festuca* de hoja fina, como *Festuca rubra* y *Festuca ovina*. La primera investigación sobre el ciclo de vida de esta especie es la de Sampson (1933), en este excelente trabajo sobre la enfermedad del estrangulamiento en varias especies de gramíneas se describe como la infección en plantas de *F. rubra* es en la mayoría de los casos asintomática y el hongo se transmite por semilla, es decir, la interacción entre *E. festucae* y *Festuca rubra* es de tipo II o mixta. En el estudio de Sampson se identificaron todas las especies de endofitos sistémicos causantes de estrangulamiento en gramíneas como pertenecientes al taxón *Epichloë typhina*. Posteriormente, al demostrarse la existencia de diversas especies de *Epichloë* y la especificidad de huésped de estas, los aislados de *Epichloë* asociados a *Festuca rubra* y otras festucas de hoja fina se identificaron como *E. festucae*, basándose en la fertilidad de cruzamientos entre aislados de diversas especies de huésped y la morfología de ascoesporas y cultivos puros (Leuchtman et al., 1994).

Festuca rubra es una gramínea común en pastos naturales de zonas templadas de Eurasia, y la península ibérica y el norte de África son un centro de diversidad genética de esta especie (St. Yves, 1930). En poblaciones naturales de *Festuca rubra* tanto en zonas de pastos semiáridos como en acantilados marinos cerca del 70% de las plantas de están infectadas por *E. festucae* (Zabalgogazcoa et al., 1999, 2006b). En estas poblaciones es común la existencia

de linajes clonales del hongo, que indican un predominio de la reproducción asexual por semilla, aunque existe una considerable diversidad genética cuando se analizan distintas poblaciones (Arroyo et al., 2002).

Epichloë festucae es un hongo mutualista, a pesar de la elevada tasa de infección en plantas en poblaciones naturales, la aparición de estromas es extremadamente rara (Zabalgogezcoa et al., 1999) y resulta imposible distinguir a simple vista las plantas infectadas de las no infectadas. Sin embargo, en plantas de *Festuca rubra* infectadas por *E. festucae* se ha descrito un aumento de la tolerancia a mamíferos e invertebrados herbívoros (Bazely et al., 1997; Wilkinson et al., 2000), enfermedades causadas por hongos, (Clarke et al., 2006), tolerancia al aluminio en el suelo (Zaurov et al., 2001) y un mayor contenido de algunos nutrientes en suelos pobres (Zabalgogezcoa et al., 2006a).

Festuca rubra es una especie comúnmente utilizada en mezclas de gramíneas para céspedes, en la actualidad diversas empresas del sector de las semillas comercializan variedades de *Festuca rubra* infectadas por *Epichloë festucae*, en España Semillas Zulueta, y Fitó son algunas de las empresas que disponen de variedades endofíticas. La selección de genotipos de *Epichloë festucae* y combinaciones planta-hongo con perfiles de alcaloides apropiados para la mejora del rendimiento de las plantas es una estrategia utilizable para la aplicación de *E. festucae* en la mejora de céspedes (Arroyo et al., 2002; Zabalgogezcoa y Vázquez de Aldana, 2007).

V. Los Virus

Un virus es un conjunto de una o más moléculas de ácido nucleico, normalmente encapsidado en una o más cubiertas protectoras de naturaleza proteica o lipoprotéica, que es capaz de dirigir su propia replicación única y exclusivamente en el interior de una célula hospedadora adecuada. El material

genético de los virus puede ser DNA o RNA, que a su vez puede ser de cadena sencilla o doble, lineal o circular, o constituido por una sola molécula o varios segmentos del ácido nucleico. Los genomas de RNA de cadena sencilla pueden ser de polaridad positiva (+), que directamente sirven como RNA mensajero, o de orientación negativa (-), que necesitan de una RNA polimerasa viral para sintetizar la cadena complementaria que sirve como RNA mensajero.

Los virus de RNA son los parásitos moleculares que más frecuentemente afectan a animales y plantas. Diversos estudios comparativos de su estructura, organización genética y tipo de replicación, muestran que los virus de RNA utilizan estrategias muy dispares para asegurar su multiplicación en las células y establecerse como partículas libres. Una de las características más destacables de los virus de RNA es la excepcional diversidad de su organización genómica y de su modo de expresión.

Debido a la enorme diversidad de virus existente, a su amplio rango de hospedadores, y a que ocuparía mucho espacio hablar de cada uno de ellos y sus peculiaridades, en esta sección nos centraremos en la descripción de los micovirus de RNA, ya que es en este grupo donde están incluidos los virus de *Epichloë festucae*, objeto de esta tesis.

VI. Origen de los virus de RNA

El origen de un virus o elemento genético se corresponde con el momento en el que alcanza la independencia en su replicación y evolución con respecto a las macromoléculas de las cuales deriva y solo alcanza el estatus de un elemento genético nuevo e independiente cuando adquiere información genética para determinar su propia propagación (Strauss et al., 1996).

No está muy claro el origen de los virus de RNA, ya que se discute que pueda ser monofilético o polifilético. La teoría de un origen monofilético sugiere

que todos los virus de RNA se han originado de un conjunto de dominios, los cuales todavía están en cierta manera presentes, aunque con diferente forma (Gorbalenya, 1995). La naturaleza modular de los genomas víricos ha sido comprobada por estimaciones filogenéticas usando diferentes genes (Morozov et al., 1989). Algunas de estas variaciones en la organización genómica y la historia evolutiva de los genes de virus parecen haber surgido de infecciones mixtas a largo plazo, en donde algunos genes de un virus se perdieron o fueron reemplazados por homólogos en otros virus. La presencia de genes con distinto origen surge por recombinación de genes de varios virus ancestrales (Gibbs, 1995). Este es el caso de el virus del "dwarf mosaic" que afecta a la cebada ya que aparentemente posee un RNA-1 derivado de un *Luteovirus*, mientras que el RNA-2, que codifica su propia RdRp (Polimerasa de RNA dependiente de RNA) es muy similar a los de *Carmovirus* y *Tombusvirus* (Demler et al., 1993). Por otro lado, la teoría polifilética defiende que los dominios se originan a partir de genes relacionados que van a proceder de diferentes células de las plantas hospedadoras, y que la variedad de supergrupos surgirá después de forma independiente (Gorbalenya, 1995). Ambas teorías son posibles, y una combinación de las dos podría también ser un reflejo real de la evolución actual en el caso concreto de los virus de plantas.

En el caso particular de las RdRp, estas pueden haber tenido un ancestro común, mientras que otros dominios fueron adquiridos de los hospedadores para la adquisición de nuevas funciones que permitan la adaptación a nuevos nichos o nuevos mecanismos de movimientos y transmisión. La superfamilia de RdRp incluye tanto las enzimas codificadas por eucariotas como por procariotas. Esto sugiere que las moléculas que codifican para la RdRp pueden haber surgido antes que las células eucariotas simples (Poch et al., 1989).

VII. Los micovirus

Características de los micovirus

Los virus que infectan a los hongos son denominados micovirus. El primer micovirus conocido fue descubierto en el champiñón comestible *Agaricus bisporus*. Fue en la década de los 40 cuando se describió la enfermedad de La France en champiñones. Dicha enfermedad es consecuencia de una infección causada por un virus de RNA; hecho que no pudo ser corroborado hasta casi veinte años después, cuando fue demostrada la presencia de partículas víricas en champiñones enfermos (Hollings, 1962). Desde el descubrimiento de los primeros micovirus se ha podido comprobar que su presencia es un hecho bastante común en hongos (Ghabrial y Hillman, 1999; Nuss y Koltin, 1990; Herrero et al., 2009). Se cree que podrían infectar a miles de especies fúngicas, pero sin embargo muy pocos han sido aislados y caracterizados (Moore, 1990). La razón de su tardío descubrimiento, puede residir en que a diferencia del resto de virus de animales, plantas o bacterias, los micovirus a menudo no producen cambios fenotípicos en su hospedador, haciéndolos pasar desapercibidos.

Las partículas típicas de micovirus poseen forma isométrica y un diámetro que oscila entre 25 y 50 nm. Esta partícula contiene un genoma de RNA de doble cadena (RNA_{bc}) y en algunos casos de ssRNA o ssDNA, y está rodeado por una cápsida proteica.

Las vías de transmisión de este tipo de virus son un hecho que todavía no está claro, ya que no pueden iniciar por si mismos una infección extracelular en sus hospedadores y tampoco se conoce la existencia de ningún vector natural. Lo que sí se sabe es que los virus de dsRNA de hongos son transmitidos de forma similar a la transferencia de plásmidos en procariotas. Es decir que los micovirus son transmitidos intracelularmente durante la división celular, la esporogénesis y la fusión celular, desconociéndose una fase extracelular en su ciclo de vida. Como

consecuencia directa de este tipo de transmisión intracelular la variedad de hospedadores naturales de los micovirus se limita a individuos pertenecientes a la misma especie o a especies similares con compatibilidad vegetativa (Anagnostakis et al., 1998; Ghabrial y Patterson, 1999, Soldevila et al., 1998). Los hongos filamentosos han evolucionado regulando genéticamente sistemas de autoreconocimiento que evitan la fusión de hifas entre variedades diferentes. Adicionalmente existe una respuesta apoptótica que ocurre entre variedades incompatibles y que es regulada por múltiples genes de incompatibilidad vegetativa. La existencia de estos sistemas de incompatibilidad crea una barrera significativa que impide el movimiento de estos virus a nuevas poblaciones de hongos (McCabe et al., 1999). Si una población es clonal hay una expansión endémica de dsRNA. Si la población consiste de una variedad de grupos con incompatibilidad vegetativa la expansión del virus está restringida a variedades del mismo grupo de compatibilidad vegetativa (McCabe et al., 1999).

Diversidad y clasificación en micovirus

Se han caracterizado micovirus en *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* y *Zygomycetes*, así como en *Oomycetes*.

El conjunto de virus conocidos que infectan a hongos está formado por los miembros de nueve familias además de varios virus aún sin asignar a ningún grupo taxonómico (Van Regenmortel et al., 2000, Ghabrial y Suzuki, 2008). La mayoría de los micovirus conocidos con genomas de RNA_{abc} quedan clasificados en cuatro familias: *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Hypoviridae* y *Chrysoviridae*. El resto tienen genomas de RNA, exceptuando los *Rhizidiovirus* con genoma de DNA_{abc}; virus con genomas de RNA de polaridad negativa o DNA de cadena sencilla aun no han sido encontrados en hongos (Ghabrial y Suzuki, 2008). De todas estas familias solo algunas infectan únicamente hongos, como son las familias *Narnaviridae*,

Chrysoviridae y *Hypoviridae*, mientras que las otras familias infectan hongos, protozoos, plantas o animales.

La relación de familias de micovirus es la siguiente:

- ***Hipoviridae***: no forman verdaderas partículas víricas, sino que poseen membranas irregulares; una molécula lineal de RNA de unas 9-13 Kbp sin segmentar forma su genoma. Varios miembros de esta familia son reconocidos, pero de momento tan solo han sido encontrados en *Cryphonectria parasítica*.

- ***Partitiviridae***: Los viriones son isométricos y poseen un genoma de dos segmentos de RNA lineal con un tamaño total de 4-10 Kbp. La mayoría de los miembros de esta familia infectan hongos aunque también pueden infectar plantas.

- ***Barnaviridae***: Las partículas víricas son baciliformes, con un genoma lineal de una molécula de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva, y un tamaño de aproximadamente 4Kbp. Está formada por un solo miembro (MBV) que está presente en *Agaricus bisporus*, y suele aparecer en champiñones cuando presentan la enfermedad de La France, aunque no es el agente causal de la enfermedad.

- ***Narnaviridae***: Carecen de cápsida. Su genoma está formado por un segmento de RNA de cadena sencilla con un tamaño de 2-3Kb. Distintos miembros de esta familia infectan a *Saccharomyces cerevisiae*.

- ***Metaviridae***: Se trata de retrotransposones que están poco caracterizados. Su genoma es un RNA de cadena sencilla con polaridad positiva, y un tamaño de 4-10 Kb. Los miembros de esta familia están presentes tanto en hongos como en plantas e invertebrados.

- ***Pseudoviridae***: En este caso también son retrotransposones que están poco caracterizados. Su genoma es una hebra sencilla de RNA con sentido

positivo, y con 5-8 Kb de tamaño. Sus hospedadores son diversos: hongos, plantas e invertebrados.

- **Reoviridae:** Tienen un genoma de RNAbc lineal, que está segmentado en 10-12 fragmentos, dependiendo del género y su tamaño varía de 18 a 30 Kb. La cápsida es isométrica de 60-80nm y que puede estar envuelta por dos o tres capas lipídicas. Sus hospedadores son invertebrados, vertebrados, hongos y plantas. Siendo únicamente el género *mycoreovirus* el correspondiente a hongos.

- **Chrysoviridae:** Tienen un genoma de RNAbc. Las partículas tienen una cápsida icosaédrica con un diámetro de 35-40 nm. El genoma está formado por cuatro segmentos de ARNbc lineal con tamaños comprendidos entre 2.7 y 3.5 Kb. Estos cuatro segmentos presentan secuencias altamente conservadas en ambos extremos. Se han identificado en *Penicillium*.

- **Totiviridae:** Los viriones pertenecientes a esta familia son isométricos y poseen una sola molécula lineal de RNAbc con un tamaño que oscila entre 4-7Kbp, y están encapsidados en partículas isométricas de 40 a 50 nm (Ghabrial et al., 1995). Estos infectan persistentemente hongos, como *Helminthosporium victoriae* o *Saccharomyces cerevisiae*, o protozoos como *Leishmania braziliensis* y *Giardia lamblia*.

- **Rhizidiavirus:** Tienen una cápsida isométrica con un genoma lineal de DNA de doble cadena, y un tamaño de 27Kb, y únicamente han sido encontrados en *Rhizidiomycetes*, género perteneciente a *Hypochytriomycota* y está en duda el considerar a miembros de esta familia como micovirus.

Efectos producidos por infecciones micovíricas

Los micovirus se diferencian de los virus de animales o plantas en que generalmente no causan efectos aparentes en su hospedador y muchos pueden ser considerados como no virulentos, a pesar de que células aparentemente "sanas" pueden contener una gran cantidad de partículas virales (Lemke y Nash,

1974); por ejemplo, en algunas levaduras puede haber de 100 a 300 viriones en cada célula sin que se observen efectos obvios en la célula hospedadora. Una posible razón de la "avirulencia" puede ser el tiempo de la replicación viral. En un estudio de infección viral en *Penicillium stoloniferum* se observó que la síntesis de dsRNA y viriones ocurre después de que la fase de crecimiento exponencial del hongo haya terminado y la síntesis de macromoléculas ha declinado (Ghabrial, 1980); sin embargo en algunos casos los micovirus causan daños en el hospedador, haciendo que las cepas infectadas crezcan mas lentamente o se desarrollen de forma anormal, aunque la lisis de las células infectadas sea realmente poco probable, como en el caso de *Ophiostoma (=Ceratocystis) ulmi* (Buck, 1986).

Aunque la mayoría de los micovirus que infectan hongos patógenos de plantas no parecen afectar al fenotipo de sus hospedadores, existen casos donde la presencia de micovirus está relacionada con la hipovirulencia. Éste fenómeno reduce la virulencia de los hongos patógenos de plantas. Es el caso particular de las infecciones por hypovirus en *Cryptonectria parasitica* donde el virus es el responsable de la atenuación de la virulencia de su hospedador (Ghabrial, 1994; Anagnostakis et al., 1998). Los aislados de *C. parasitica* infectados muestran sectorización con frecuencia, baja esporulación, crecimiento anormal y reducción de virulencia sobre el castaño. Algunos miembros de la familia *Hipoviridae* han sido empleados como arma de control biológico de la enfermedad del chancro del castaño, causado por *C. parasitica*.

Los sistemas "asesinos" de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y del carbón *Ustilago maydis* están correlacionados con infecciones virales. Por lo general las cepas asesinas de cualquiera de los casos mencionados, están infectadas por virus, y producen toxinas proteicas extracelulares (análogas de las bacteriocinas) a las que son inmunes (Tavantzis, 2002).

Además existe el caso de un virus cuya presencia confiere mayor tolerancia térmica a la planta en la que está presente su hongo hospedador: *Curvularia protuberata*. Este hongo endofítico que infecta raíces confiere tolerancia al calor a su planta hospedadora cuando está infectado por el virus CThTV (Márquez et al., 2007). En este caso hablamos de un virus beneficioso para su huésped, categoría en la que aún no se ha incluido ningún virus más.

La ausencia de síntomas en el hospedador beneficia en cierta manera a la supervivencia de hospedador y micovirus. De esta forma los virus de dsRNA son capaces de hacer un uso eficiente de las proteínas hospedadoras para su replicación. A su vez las células hospedadoras evolucionan para soportar un determinado nivel de replicación, mas allá del cual la infección vírica podría llegar a ser patogénica. La patogénesis vírica junto con la muerte de la célula acabaría con la eliminación del virus, puesto que éste carece de infectividad extracelular. Así un estado asintomático beneficia a ambos: virus y hospedador (Lemke, 1979).

VIII. Los micovirus de *Epichloë festucae*

Los conocimientos previos que fundamentan esta tesis provienen de un trabajo donde se describió la presencia de dos elementos de RNAbc en aislados del endófito *Epichloë festucae* (Zabalgogezcoa et al., 1998). Uno de ellos corresponde a una molécula de 5.2 Kbp encapsidada en partículas isométricas de aproximadamente 50 nm; el otro elemento, tiene un tamaño de 3.2 Kbp y no parece estar encapsidado. La secuencia nucleotídica de ambos elementos fue considerada diferente, ya que una hibridación entre ambos elementos mostró que el de menor tamaño no es un derivado del mayor. El tamaño de ambos elementos de RNAbc permite suponer que podrían ser genomas de micovirus.

IX. Bibliografía

- Anagnostakis, S.L., Chen, B., Geletka, L.M., Nuss D.L. (1998). Hypovirus transmission to ascospore progeny by field-released transgenic hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopatology* 88, 598-604.
- Arnold, A.E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi, progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21, 51-66.
- Arroyo, R, Martínez Zapater, JM, García Criado, B, Zabalgoeazcoa, I. (2002). The genetic structure of natural populations of the fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Molecular Ecology* 11, 355-364.
- Bacon, C.W., Porter, J.K., Robbins, J.D., Luttrell, C.S. (1977). *Epichloë typhina* from toxic all fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 34, 576-581.
- Bazely, D.R., Vicari, M., Emmerich, S., Filip, L., Lin, D., Inman, A. (1997). Interactions between herbivores and endophyte-infected *Festuca rubra* from Scottish islands of St. Kilda, Bembecula and Rum *Journal of Applied Ecology* 34, 847-860.
- Brilman, LA. (2005). Endophytes in turfgrass cultivars. En *Neotyphodium* in cool season grasses (Roberts CA, West CP, Spiers DE., eds). Blackwell Publishing, Iowa, USA. pp. 341-349.
- Buck, K.W. (1986). 1-84 pp. *Fungal Virology.*, edited by K.W. Buck, Boca Raton, FL.
- Clarke, B.B, White, J.F., Hurley, H., Torres, M.S., Sun, S., Huff, D.R. (2006). Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease* 90, 99-998.
- Demler, S.A., Rucher, D.G., Dezoeten, G.A. (1993). The chimeric nature of the genome of pea ention mosaic virus, the independent replication of RNA 2. *Journal of General Virology* 74, 1-14.

- Ellis, M.B., Ellis, J.P. (1988). Microfungi on miscellaneous substrates, an identification handbook. Croom Helm, London.
- Fletcher, L.R., Harvey, I.C. (1981). An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. New Zealand Veterinary Journal 29, 185-186.
- Freeman, E.M. (1902). The seed fungus of *Lolium temulentum* L., the darnel. Philosophical Transactions of the Royal Society, London Series B 196, 1-27.
- Guerin, M.P. (1898). Sur la presence d'un champignon dans l'ivraie (*Lolium temulentum* L.). Journal de Botanique 12, 230-238.
- Ghabrial, S.A. (1980). Effects of fungal viruses on their hosts. Annual Review of Phytopathology 18, 441-461.
- Ghabrial, S.A. (1994). New developments in Fungal Virology. Advances in Virus Research 43, 303-388.
- Ghabrial, S.A., Bruenn, J.A., Buck, K.W., Wickner, R.B., Patterson, J.L., Stuart, K.D., Wang, A.L., Wang, C.C., (1995). Virus Taxonomy. Sixth report of the International Committee on taxonomy of viruses. Murphy, F.A., L.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P, Martelli, M.A. Mayo, M.D. Summers, New York.
- Ghabrial, S.A., Patterson, J.L. (1999). Totiviruses (*Totiviridae*). En, A.G.a.R.W. (eds) (Ed), Encyclopedic of virology, 2ª Edition ed., pp. 1808-1812. Academic Press, San Diego.
- Ghabrial, S.A. Suzuki, N. (2008). Fungal viruses, p. 284-291. En BWJ Mahy and MHV Van Regenmortel (ed.), Encyclopedia of virology, 3rd ed., vol.
- Gibbs, M. (1995). The luteovirus supergroup, rampant recombination and persistent partnerships, 603 pp. Molecular basics of Virus evolution. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

- Gorbalenya, A. (1995). Origin of RNA viral genomes, approaching the problem by comparative sequence analysis, 49-65 pp. Molecular basis or Virus Evolution. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Hallings, M. (1962). Viruses associated with dieback disease of cultivated mushrooms. *Nature* 196, 962-965.
- Herrero, N, Sánchez, S, Zabalgogezcoa, I. (2009). Mycoviruses are common among different species of fungal endophytes of grasses. *Archives of Virology* 154, 327-330.
- Hyde, K.D., Soyong K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33, 163-173.
- Kuldau, G, y Bacon, C. (2008). Clavicipitaceous endophytes, Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses *Biological Control* 46, 57-71.
- Lemke, P.A., Nash, C.H. (1974). Fungal viruses. *Bacteriological Reviews* 38, 29-56.
- Lemke, P.A. (1979). Fungal viruses, 2-7 pp. Molitoris, H.P., Hollings, H., Wood, H. A., Berlín.
- Leuchtmann, A., Schardl, C., Siegel, M.R. (1994) Sexual compatibility and taxonomy of a new species of *Epichloë* symbiotic with fine fescue grasses. *Mycologia* 86, 802-812.
- Leuchtmann, A., Clay, K., (1997). The polpulation biology of grass Endophytes. *The Mycota V Part A; Plant Relationships*, edited by Carroll/Tudzynski. Springer-Verlag, Berlín/ Heidelberg.
- Malinowski, D.P, Belesky, D.P. (2000). Adaptations of endophyte-infected cool season grasses to environmental stresses, mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, 40, 923-940.
- McCabe, P.M., Pfeiffer, P., Alfen, N.K.V. (1999). The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends in Microbiology* 7, 377-381.

- Moore, L.E. (1990). Fundamentals of fungi. Prentice Hall, 3ra ed. New Jersey, U.S.A.
- Morozov, S.Y., Dolja, V.V., Atabekov, J.G. (1989). Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *Journal of Molecular Evolution* 29, 52-62.
- Márquez, L.M., Redman R.S., Rodríguez, R.J., Roossinck, M.J. (2007). A virus in a fungus in a plant, three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315, 513-515.
- Nuss, D.L., Koltin, Y. (1990). Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 28, 37-58.
- Paterson, J.A., Kerley, M.S., Larson, B., Forcherio, J., Samford M. (1995). The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity. *Journal of Animal Science* 73, 889.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal* 8(12), 3867-74.
- Rodríguez, R., Redman, R. (2008). More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own, plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 59, 1109-1114.
- Rodríguez, R.J, White, J.F. Jr, Arnold, A.E., Redman, R.S. (2009). Fungal endophytes, diversity and functional roles *New Phytologist* 182, 314-330.
- Saint-Yves, A. (1930). Aperçu sur la distribution géographique des *Festuca* (subgen. *Eu-Festuca*). *Candollea* 4, 146-165.
- Sampson, K. (1933). The systemic infection of grasses by *Epichloë typhina*. *Transactions of the British Mycological Society*, 18, 30-47.
- Sánchez Márquez, S., Bills, G.F., Zabalgoitia, I. (2007). The endophytic mycobiota of *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity* 27, 171-195.

- Sánchez Márquez, S., Bills, G.F., Zabalgoceazcoa, I. (2008). Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Diversity* 33, 87-100.
- Schardl, C.L., Leuchtman, A., Spiering M.J. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* 55, 315-340.
- Schardl, C.L., Leuchtman, A., Tsai, H.F., Collett, M.A., Watt, D.M., Scott, D.B.(1994). Origin of a fungal symbiont of perennial ryegrass by interspecific hybridization of a mutualist with the ryegrass choke pathogen, *Epichloë typhina*. *Genetics*, 136, 1307-1317.
- Schulz, B., Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Review. Mycological Research*. 109(6), 661-686.
- Soldevila, A.I., Huang, S., Ghabrial, S.A. (1998). Assembly of the Hv190S Totivirus capsid is independent of posttranslational modification of the capsid protein. *Virology* 251, 327-333.
- Stone, J.K., Polishook, J.D., White, J.F. Jr. (2004). Endophytic fungi. En, *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods* (eds. Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S.). Elsevier Academic Press, USA. pp. 241-270.
- Strauss, E.G., Strauss, JH., Levine A. (1996). Virus Evolution. In *fields Virology*, 153-171 pp, edited by K.D.H.P.E.a. B.N. Fields, Chapter 6. Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Strobel G.A. (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology* 22, 315-333.
- Tsai, H.F., Liu, J.S., Staben, C., Christensen, M.J., Latch, G.C.M., Siegel, M.R., Schardl, C.L. (1994). Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 2542-2546.

- Tavantzis, S.M., Lakshman, Liu, C. (2002). Double-stranded RNA elements modulating virulence in *Rhizoctonia solani*. In, DsRNA genetic elements, concepts and applications in agriculture, forestry and medicine (S.M. Tavantzis, ed), Pp. 191-211. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner R.B. (2000). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of viruses, Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by A. Press, London, UK.
- Vázquez de Aldana, BR, Zabalgogezcoa, I, Rubio de Casas, R, García Ciudad, A, García Criado, B. (2009). Relationships between the genetic distance of *Epichloë festucae* isolates and the ergovaline and peramine content of their *Festuca rubra* hosts. *Annals of Applied Biology* (en prensa).
- Vogl, A. (1898). Mehl und die anderen Mahlproducte der cerealien und leguminosen. *Zeitschrift für Nahrungsmittel-Untersuchung. Hygiene und Waarekunde* 2, 25-29.
- West, C.P, Izekor, E., Oosterhuis, D.M., Robbins, R.T. (1988). The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant Soil* 112, 3-6.
- White, J.F.J. (1988) Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. *Mycologia* 80, 442-446.
- Wilkinson, H.H., Siegel, M.R., Blankenship, J.D., Mallory, A.C., Bush, L.P. Schardl C.L. (2000). Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 1027-1033.
- Zabalgogezcoa, I. (2008). Fungal endophytes and their interactions with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6, 138-146.

- Zabalgogezcoa, I., Vázquez de Aldana, B.R., García Criado, B., García Ciudad, A. (1999). The infection of *Festuca rubra* by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in Mediterranean permanent grasslands. *Grass and Forage Science*, 54, 91-95.
- Zabalgogezcoa, I., García Ciudad, A., Vázquez de Aldana, B.R., García Criado, B. (2006^a). Effects of the infection by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in the growth and nutrient content of *Festuca rubra*. *European Journal of Agronomy* 24, 374-384.
- Zabalgogezcoa, I., Romo, M., Keck, E., Vázquez de Aldana, B.R., García Ciudad, A., García Criado, B. (2006b). The infection of *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* by *Epichloë festucae*. *Grass and Forage Science* 61, 71-76.
- Zabalgogezcoa, I., Vazquez de Aldana, B.R. (2007). Potencial del hongo endofítico *Epichloë festucae* para la mejora del césped. *Innovación y Tecnología Agroalimentaria* 2, 145-157.
- Zaurov, D.E., Bonos, S., Murphy, A., Richardson, M., Belanger, F.C. (2001). Endophyte infection can contribute to aluminium tolerance in fine fescues. *Crop Science*, 41, 1981-1984.

Objetivos

I. Objetivo general

Evaluar las características biológicas y moleculares de un virus que infecta al hongo endofítico *Epichloë festucae* que está presente en *Festuca rubra*.

II. Objetivos específicos

- Caracterización molecular del posible virus asociado a un RNA de doble cadena de 5.1Kbp.
- Estudio de la incidencia de infecciones víricas dentro de poblaciones naturales del hongo endofítico *Epichloë festucae*.
- Determinación de los mecanismos de transmisión de virus en poblaciones de *Epichloë festucae*.
- Efectos de la infección vírica en el crecimiento de cultivos de *Epichloë festucae*.

Capítulo 1: Incidencia de RNAbc en poblaciones de *E. festucae*

I. Introducción

La incidencia de infecciones por micovirus entre individuos pertenecientes a determinadas especies de hongos ha sido estudiada en pocos casos. El método utilizado en todos ellos ha sido el diagnóstico de la presencia de elementos de RNAbc. En estos estudios es un hecho relativamente común la detección de múltiples elementos de RNAbc, que indican infecciones causadas por virus con genomas multipartitos, infecciones mixtas o la presencia de virus satélites o RNAbc defectuosos (Ghabrial, 2008). Sin embargo son muy pocos los casos en los que el estudio se centra únicamente en un solo elemento de RNAbc; dos ejemplos son el caso de un totivirus presente en *Ustilago maydis*, con incidencias que oscilan desde un 34% hasta el 100% dependiendo de las localidades (Voth et al., 2006) y uno de los micovirus mejor conocidos y mas estudiados; el hipovirus CHV-1 cuyo huésped es *Cryphonectria parasitica* (Peever et al., 1998), con una incidencia del 28% en aislados del este de Norte América. En *Cryphonectria parasitica* también se han realizado estudios de incidencia de otros elementos de RNAbc en China y Japón (Peever et al., 1998).

Entre los estudios en los que se ha estimado la incidencia de múltiples elementos de RNAbc que podrían indicar infecciones mixtas, destacan los realizados en *Aspergillus flavi*, en los que se encontraron hasta 9 elementos de RNAbc en el 13% en los aislados analizados (Elias y Cotty, 1996). En un estudio de varias especies de *Aspergillus* en el que se evaluó el coste que suponía para el hongo la presencia de virus en aislados con síntomas de infección viral, se determinó que el 10% de las especies analizadas están infectadas por alguno de 8 elementos diferentes de RNAbc (Van Diepeningen et al., 2006).

En aislados de *Botrytis cinerea* se encontraron hasta 8 elementos de RNAbc diferentes en el 72% de los aislados analizados (Howitt et al., 1995).

En *Chalara elegans* Bottacin y colaboradores (1994) mostraron los efectos de la presencia de micovirus en el crecimiento y la virulencia del hongo, se detectaron 6 elementos de RNAbc, dos de los cuales representaban genomas de virus de la familia *Totiviridae*, y el 84% de los aislados analizados resultaron estar infectados por virus.

También en *Monilinia fructicola* se detectó la presencia de 7 elementos de RNAbc, encontrándose alguno de estos elementos en el 74% de los aislados analizados (Tsai et al., 2004).

Por otro lado, otros estudios determinaron que un 70% de los aislados de *Pyricularia oryzae* contienen RNAbc, detectándose al menos 12 elementos diferentes, aunque no se ha observado relación alguna con la patogenicidad del hongo (Hunst et al., 1986).

En *Pythium irregulare* se han detectado al menos 6 elementos de RNAbc con una incidencia del 85% (Gillings et al., 1993).

Un caso llamativo es el de *Phytophthora infestans*, donde se detectaron distintos tipos de micovirus dependiendo de la zona de procedencia de los aislados, lo que según los autores, convertía a estos micovirus en valiosos marcadores para estudios genéticos y epidemiológicos; en este caso se observó una incidencia del 36% correspondiente a 4 elementos de RNAbc, dependiendo su número de la zona de procedencia: USA, México o Europa (Tooley et al., 1989).

Todos estos ejemplos de posibles infecciones mixtas podrían llevar a pensar que la incidencia de un virus puede verse afectada por la presencia de otro; un ejemplo que puede confirmar esta hipótesis es el trabajo de Romaine y Schlanghauffer (1995) que encontraron una infección doble en aislados de

Agaricus bisporus, el *Mushroom bacilliform virus* (MBV) se detectó en el 60% de los aislados también infectados por el virus isométrico de La France (LIV); mientras que la incidencia de MBV se veía disminuida al 5% en los aislados no infectados por LIV, lo que les llevó a sugerir que la presencia del otro virus podría suponer una ayuda para la transmisión.

En resumen, aunque la variación en la incidencia parece depender de la especie hospedadora, en bastantes casos la incidencia de elementos de RNA es elevada en miembros de la misma especie.

La mayoría de los estudios de incidencia de dsRNA y micovirus han sido realizados en hongos patógenos de plantas. Por tanto es de interés determinar la incidencia de dsRNA en *Epichloë festucae*, puesto que no se trata de un hongo patógeno, sino de un simbiote mutualista. El objetivo de este primer capítulo fue determinar la frecuencia con la que aparecen los dos elementos de RNAbc que infectan a *Epichloë festucae* en aislados de este hongo endófito obtenidos de poblaciones naturales de *F. rubra*.

II. Materiales y métodos

Recolección de plantas y aislamiento de *E. festucae*.

Para obtener aislados de *Epichloë festucae* se recolectaron ejemplares de *F. rubra* en pastos de dehesa pertenecientes a 12 localidades diferentes de la provincia de Salamanca y una de Ávila (Figura 7). En estos lugares se recogieron las plantas guardando una distancia mínima de 10 metros entre cada par de plantas. Todas las plantas eran asintomáticas, con la excepción de 4 ejemplares de plantas con estromas de *E. festucae* que se obtuvieron en Los Valles, El Cabaco y Candelario.

Los endofitos se aislaron a partir de fragmentos de tallo y vaina foliar de las plantas tras un tratamiento de desinfección superficial (Bacon y White, 1994).

Del micelio emergido de fragmentos de plantas infectadas tras un periodo de 7-12 días tras la siembra en placas de agar de patata y dextrosa (PDA), se obtuvo una muestra de micelio. Los cultivos puros fueron identificados como *Epichloë festucae* en función de características morfológicas como el tamaño y la forma de conidióforos y conidios y el color blanco del micelio aéreo (White, 1988) (Figura 3). Con algunos aislados se realizó una identificación molecular por medio de la amplificación y secuenciación de la región ITS1/5.8 RNA/ITS2.

Figura 7. Localización en la provincia de Salamanca de los pastos donde fueron obtenidas plantas de *Festuca rubra* para aislar *Epichloë festucae*. Palancar (1), Servández (2), Vitigudino (3), Berrocal (4), Llen (5), Ribera de Cañedo (6), Campillo (7), Altejos (8), Los Valles (9), Sagos (10), El Cabaco (12) y Candelario (13). En la provincia de Ávila se obtuvieron plantas en la dehesa Montalvo.

Extracción de RNAbc.

Para obtener suficiente cantidad de micelio de cada aislado con el fin de determinar la presencia de RNAbc, estos fueron sembrados sobre membranas estériles de celofán en placas de PDA con cloranfenicol (200mg/l) y mantenidos en la oscuridad a una temperatura de 15-20°C durante aproximadamente un mes.

Para diagnosticar la presencia de micovirus, se procedió a la detección de RNAbc utilizando el método descrito por Morris y Dodds (1975). Aproximadamente 1g de micelio fresco de cada aislado fue pulverizado en un mortero con nitrógeno líquido. Se extrajeron los ácidos nucleicos totales añadiendo una solución de 2X STE (20 mM Tris-HCl pH 8.0; 200 mM NaCl; 2mM EDTA), 0.1% SDS, 0.001% 2-mercaptoetanol y 1.5mg/ml de bentonita). Se emplea el SDS para la ruptura de membranas celulares y la desnaturalización de proteínas, el 2-mercaptoetanol por su actividad antioxidante y la bentonita como absorbente de proteínas. Tras añadir un volumen de fenol:cloroformo (1:1) se generan dos fases: una fase fenólica que contiene lípidos, proteínas y fragmentos subcelulares, y por otro lado una fase acuosa que contiene polisacáridos, ácidos nucleicos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles, quedando la mayor parte de las proteínas en la interfase. El cloroformo aumenta la eficiencia de la extracción, por su alta densidad y por su capacidad para disolver lípidos y proteínas.

Después de esta purificación inicial, se llevó a cabo una cromatografía en celulosa CF-11 (Whatman), donde queda retenido el RNAbc cuando la concentración de etanol es igual al 15%, realizándose al menos tres lavados con STE con 15% de etanol y finalmente eluyendo el RNAbc con tampón STE sin etanol. El RNAbc se precipitó a baja temperatura con etanol y acetato sódico y los extractos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, realizándose la visualización con bromuro de etidio. Cada uno de los aislados que

resultaron negativos se analizaron de nuevo, para descartar los posibles resultados falsos negativos.

III. Resultados y discusión

Incidencia de E. festucae en plantas de F. rubra

En este estudio se observó que una media del 67,25% de las plantas analizadas resultaron estar infectadas por el hongo endofítico *E. festucae* (Tabla 3). En la tabla 3 solo se citan las 7 poblaciones en las cuales el número de plantas analizadas fue mayor que cinco, en este conjunto se detectó *E. festucae* en el 74.5% de las plantas. El rango observado fue desde un mínimo del 60% en Montalvo hasta un 90% en El Cabaco y Candelario. Estas incidencias son similares a las observadas en otras poblaciones de *F. rubra* en dehesas y en *F. rubra* subespecie *pruinosa* en acantilados marinos del norte de España, donde la incidencia es cercana al 70% (Zabalgogezcoa et al., 1999; 2005).

Tabla 3. Incidencia de *E. festucae* en siete poblaciones naturales de *Festuca rubra* infectadas en pastos de dehesa.

Población	Plantas analizadas	Plantas infectadas	Porcentaje de plantas infectadas
Servández	40	27	67.5
Palancar	33	26	78.8
Los Valles	26	18	69.2
Sagos	13	9	69.2
Montalvo	15	9	60.0
El Cabaco	20	18	90.0
Candelario	20	18	90.0

Incidencia de RNAbc en aislados de *E. festucae*.

Al analizar la presencia de RNAbc en los aislados, se detectaron 2 elementos de 5.2 y 3.2 kbp en aislados de todas las poblaciones. Sin embargo, se observó que no siempre aparecían los dos elementos juntos, sino que algunos aislados estaban infectados por ambos elementos, otros solo por el de 3.2 kbp, y un único aislado contenía el fragmento de 5.2 kbp (Figura 8). El hecho de que ambos elementos aparezcan separados en algunos aislados, junto con que una sonda de cDNA complementaria al elemento de 5.2 kb no hibridase con el de 3.2 kbp (Zabalgogezcoa et al., 1998), demuestra que ambos elementos de RNAbc son independientes y que la presencia de uno no condiciona la del otro. Por lo tanto, es posible que cada elemento de RNAbc represente el genoma de un virus distinto. En lo sucesivo, asumiendo que cada uno de estos elementos de RNAbc representa el genoma de un virus distinto, nos referiremos al fragmento de 5.2 kbp como EfV1 (*Epichloë festucae* virus 1) y al de 3.2 kbp como EfV2 (*Epichloë festucae* virus 2).

Según se desprende de experimentos de purificación de partículas de virus, el fragmento de 5.2 kbp parece estar encapsidado en partículas isométricas de unos 50 nm, mientras que el de 3.2 kbp no lo está (Zabalgogezcoa et al., 1998), por lo tanto, se puede aventurar que debido al tamaño de su genoma y morfología de las partículas, EfV1, podría ser un *Totivirus* (Wickner, et al. 2005), mientras que EfV2, aparentemente no encapsidado, podría ser un narnavirus (Buck et al., 2005).

Figura 8. Elementos de RNAbc detectados en 18 aislados de *Epichloë festucae* obtenidos en la localidad de Serváñez.

El resultado del análisis de la presencia de RNAbc en aislados de las trece poblaciones mostró un alto porcentaje de infección por EfV1 y EfV2 (Tabla 4). En las dos poblaciones con un número mayor de aislados analizados, los porcentajes de incidencia fueron 85.7% en Palancar y 61.1% en Serváñez. En estas dos poblaciones, se observaron diferencias notables en las proporciones de aislados sin virus y los infectados por uno o ambos virus (Figura 9). El número de aislados infectados por dos elementos fue mayor que el de los que tienen solo uno y solo se detectó un aislado infectado únicamente por EfV1.

En otras especies de hongos se han descrito infecciones mixtas de micovirus, es el caso de los totivirus SsRV1 y SsRV2 en *Sphaeropsis sapinea* (Preisig et al., 1998), GaRV-L1 y GaRV-L2 en *Gremmeniella abietina* (Tuomivirta and Hantula, 2005) o los totivirus ScV-L-A y ScV-L-B en *Saccharomyces cerevisiae* (Wickner et al. 2002).

Tabla 4. Incidencia de elementos de RNAbc de 5.2 kbp (EfV1) y 3.2 kbp (EfV2). En poblaciones de *Epichlöe festucae*.

Población	Nº aislados analizados	Aislados infectados por virus			Aislados sin RNAbc	Porcentaje infección vírica
		EfV1	EfV2	EfV1+EfV2		
Palancar	14	1	6	5	2	85.7
Servández	18	0	5	6	7	61.1
Vitigudino	1	0	0	1	0	100
Berrocal	1	0	1	0	0	100
Llen	4	0	1	2	1	75
R. Cañedo	2	0	1	0	1	50
Campillo	3	0	1	0	2	33
Altejos	2	0	0	1	1	50
Los Valles	6	0	0	3	3	50
Sagos	6	0	2	2	2	66.7
Montalvo	5	0	2	2	1	80
El Cabaco	6	0	1	0	5	16.6
Candelario	6	0	0	1	5	16.6
Total	73	1	20	23	30	
Frecuencia		1.37%	27.4%	31.5%	41.09%	Media: 60.63%

Figura 9. Incidencia de la infección vírica de cada uno de los elementos de RNAbc en aislados obtenidos en las poblaciones de *E. festucae* de Palancar (n= 14) y Servández (n=18).

En algunos aislados de las poblaciones de Sagos y Montalvo se observó la presencia de algunas bandas de RNAbc de tamaño distinto de EfV1 y EfV2, que podrían indicar la existencia de otros micovirus (Figura 10). Estas nuevas bandas aparecen de forma individual, y se descarta la posibilidad de que fueran consecuencia de un error de la electroforesis puesto que el desplazamiento de las bandas del marcador y las correspondientes a EfV1 y EfV2 fue normal en los dos ensayos realizados.

Figura 10. Bandas de RNAbc con tamaño diferente de EfV1 y EfV2 detectadas en algunos aislados. Estos elementos que difieren en tamaño de EfV1 y EfV2 aparecen enmarcados.

Además de las poblaciones mostradas en la Tabla 4, se analizaron 6 aislados de *E. festucae* obtenidos de plantas de *Festuca rubra* subsp. *pruinosa*, una subespecie que crece en acantilados marinos y muestra frecuencias de infección endofítica similares a las de plantas de *F. rubra* en pastos de dehesa (Zabalgogezcoa et al., 2006). En ninguno de estos aislados se detectó la presencia de RNAbc, posibles razones podrían ser que las plantas crecen a mucha distancia de las poblaciones en las que se detectaron micovirus y en ecosistemas con unas condiciones muy distintas de las de dehesas.

También se detectó la presencia de EfV1 en un aislado de *E. festucae*, obtenido de una planta de *Lolium perenne*. Los endofitos sistémicos comúnmente asociados a *L. perenne* son varias especies de *Neotyphodium* y *Epichloë typhina*,

la presencia de *E. festucae* en esta gramínea no parece ser común y podría deberse a su transmisión desde plantas de *Festuca rubra*.

IV. Conclusiones

1. EfV1 y EfV2 fueron detectados en aislados de *Epichloë festucae* de todas las localidades analizadas, lo cual indica que al menos en pastos de dehesas, donde cerca del 70% de las plantas de *Festuca rubra* están infectadas por este endófito, la dispersión geográfica de estos posibles micovirus es notable.

2. La incidencia de elementos de RNAbc es relativamente elevada en poblaciones naturales de *E. festucae* en pastos de dehesa, se detectó la presencia de RNAbc en una media del 67,25% de los individuos de cada población.

3. El hecho de que unos aislados estén infectados por EfV1 y EfV2, otros solo por EfV2 o por EfV1 demuestra que ambos elementos de RNAbc son independientes y cada uno de ellos podría representar el genoma de un micovirus distinto.

V. Bibliografía

- Bacon, C.W., White, J.F. (1994). Stains, media, and procedures for analyzing endophytes. Pp. 47-56. En: C.W. Bacon and J.F. White (eds.) *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. CRC Press, Boca Raton, FLorida.
- Bottacin, A.M., Levesque, C.A., Punja, Z.K. (1994). Characterization of RNAbc in *Chalara elegans* and effects on growth and virulence. *Phytopathology* 84, 303-312.
- Buck, K.W., Esteban, R., Hillman, B.I. (2005). Family *Narnaviridae* *Virus taxonomy: Eighth report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*, pp. 751-756. Editores C. M. Fauquet y M.A. Mayo.
- Elias, K.S., Cotty, P.J. (1996). Incidence and stability of infection by double-stranded RNA genetic elements in *Aspergillus section flavi* and effects on a flatoxigenicity. *Canadian Journal of Botany* 74, 716-725.
- Ghabrial, S.A., Suzuki, N. (2008). Fungal viruses. En: Mahy B.W.J., Van Regenmortel M.H.V. (eds) *Encyclopedia of Virology*, vol 2, 3rd edn. Elsevier, Oxford, pp 284-291.
- Gillings, M.R., Tesoriero, L.A., Gunn, L.V. (1993). Detection of double-stranded RNA and virus-like particles in Australian isolates of *Pythium irregulare*. *Plant Pathology* 42, 6-15.
- Howitt, R.L.J., Beever, R.E., Pearson, M.N., Forster, R.L.S. (1995). Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 99, 1472-1478.
- Hunst, P.L., Latterell, F.M., Rossi, A.E. (1986). Variation in double stranded RNA from isolates of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 76.674-678.
- Morris, T.J., Dodds, J.A. (1979). Isolation and analysis of double-strand RNA virus-infected plant and fungal tissues. *Phytopathology*, vol. 69, 8:854-858.

- Peever, T.L., Liu, Y-C., Wang, K., Hillman, B.I., Foglia, R., Milgroom, M.G. (1998). Incidence and diversity of double -stranded RNAs occurring in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in China and Japan. *Phytopathology* 88:811-817.
- Preisig, O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (1998). Coinfection of a fungal pathogen by two distinct double-stranded RNA viruses. *Virology* 252:399-406.
- Romaine, C.P., Schlagnhauffer, B. (1995). PCR analysis of the viral complex associated with La France disease of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2322-2325.
- Tooley, P.W., Hewings, A.D., Falkenstein, K.F. (1989). Detection of double-stranded RNA in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 79, 470-474.
- Tsai, P.F., Pearson, M.N., Beever, R.E. (2004). Mycoviruses in *Monilinia fructicola*. *Mycology. Research* 108, 907-12.
- Tuomivirta, T.T., Hantula, J. (2005). Three unrelated viruses occur in a single isolate of *Gremmeniella abietina* var. *abietina* type A. *Virus Research* 110, 31-39.
- Van Diepeningen, A.D., Debets, A.J.M., Hoekstra, R.F. (2006). Dynamics of RNAbc mycoviruses in black *Aspergillus* populations. *Fungal Genetics and Biology*, 43, 446-452.
- Voth, P.D., Mairura, L., Lockhart, B.E., May, G. (2006). Phylogeography of *Ustilago maydis* virus H1 in the USA and Mexico. *Journal of General Virology* 87, 3433-3441.
- Wickner, R.B., Wang, C.C., Patterson, J.L. (2005). Totiviridae. En: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. y Ball, L.A. (Eds.), Totiviridae. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, pp. 571-580.

- Zabalgogezcoa, I., Aldana, B.R.V., Criado, B.G., Ciudad., A.G. (1998). The infection of *Festuca rubra* by fungal endophyte *Epichloë festucae* in Mediterranean permanent grasslands. *Grass and Forage Science* 54, 91-95.
- Zabalgogezcoa, I., Vázquez de Aldana, B.R., García Criado, B., García Ciudad, A. (1999). The infection of *Festuca rubra* by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in Mediterranean permanent grasslands. *Grass and Forage Science* 54, 91-95.
- Zabalgogezcoa, I., Romo, M., Keck, E., Vázquez de Aldana, B.R., García Ciudad, A., García Criado, B. (2006). The infection of *Festuca rubra* subsp. *Pruinosa* by *Epichloë festucae*. *Grass and Forest Science* 61, 71-76.

Capítulo 2: Mecanismos de transmisión y persistencia de los virus de *Epichloë festucae*

I. Introducción

La elevada incidencia de EfV1 y EfV2 en poblaciones naturales de *Epichloë festucae* indica la existencia de un eficiente mecanismo de transmisión de estos virus.

¿Cómo se transmiten los virus de hongos?. Como dijimos en la introducción, no se conoce un mecanismo de transmisión extracelular ni ningún vector de micovirus (Ghabrial et al., 2008). Por tanto, la única vía que los micovirus podrían emplear sería la transmisión directa de célula a célula fúngica, este tipo de transmisión puede ocurrir de dos formas, horizontalmente por medio de anastomosis entre distintos individuos o verticalmente por transmisión a las esporas sexuales o asexuales, como veremos a continuación.

Transmisión por anastomosis

Este tipo de transmisión se produce entre hifas compatibles de distintos individuos que se fusionan y permiten el movimiento de citoplasma desde un micelio a otro. De esta forma las partículas de virus localizadas en el citoplasma o en mitocondrias se transmitirán durante la fusión celular.

La anastomosis solo se va a producir si existe compatibilidad entre dos aislados. Por tanto esta compatibilidad va a determinar el potencial de transmisión del virus. El momento en que se produce la anastomosis puede variar, en algunas especies es común que se produzca tras la germinación de esporas (Smith et al., 1996), mientras que en otros casos se produce mas tarde. Si durante el proceso un núcleo pasa de un micelio al otro, el

proceso puede dar lugar a dicariontes, que en caso de ser los núcleos distintos dará lugar a un organismo heterocariótico.

La transmisión de micovirus por anastomosis se ha descrito en *Rhizoctonia solani* (Charton et al., 2007), *Cryphonectria parasitica* (Cortesi et al., 2001), *Neurospora crassa* (Roca et al., 2005) y otras especies. Sin embargo la transmisión interespecífica de micovirus por fusión de hifas solo se ha observado entre especies similares, un ejemplo es la transmisión de micovirus de *Sclerotinia sclerotiorum* a *S. minor* (Melzer et al., 2002).

Transmisión a esporas sexuales y asexuales

Puede llevarse a cabo a través de esporas asexuales producidas por un aislado infectado, o de esporas sexuales cuando al menos uno de los parentales está infectado por virus. El éxito de una u otra ruta de transmisión puede variar dependiendo del virus, de la especie del hongo y de los tipos de espora que produzca.

Las esporas asexuales o conidios se producen a partir de hifas modificadas y es durante el proceso de conidiogénesis cuando algunos micovirus van a ser transmitidos. En varios micovirus de *Ascomycetes* y *Basidiomycetes* se ha constatado la transmisión a conidios. Una de las mayores tasas de transmisión de micovirus a conidios fue observada en *Magnaporthe grisea*, con un valor del 94% (Chun et al., 1997), mientras que en un partitivirus presente en *Fusarium graminearum* la transmisión a conidios es del 50%, (Chu et al., 2002).

Además de la variación entre especies, las tasas de transmisión por conidios también pueden variar dependiendo de los genotipos fúngicos; por ejemplo, en *Heterobasidion annosum* el porcentaje de transmisión por

conidios de un *partitivirus* varía desde un 3% hasta un 55%, dependiendo del aislado (Ihrmark et al. 2002).

Son menos los ejemplos conocidos de micovirus que se transmiten por medio de esporas sexuales, ascoesporas o basidioesporas, lo que llevó a sugerir que la transmisión a esporas sexuales es menos común en aquellos hongos en los cuales la reproducción sexual forma parte importante de su ciclo de vida (Varga et al. 2003). Sin embargo hay especies como *Monilinia fructicola* donde el 74% de los aislados pueden estar infectados por micovirus y donde es probable que la transmisión se realice a través de la reproducción sexual, ya que es un hecho habitual en *Monilinia* (Tsai et al., 2004); o de *Fusarium graminearum*, que se transmite a través de conidios y ascosporas con incidencias que pueden llegar hasta el 100 % (Chu et al., 2004). La transmisión de virus a basidiosporas ha sido constatada en *Agaricus bisporus* (Romaine et al. 1995) y *Heterobasidium annosum* (Ihrmark, 2002). En éste último caso hay que destacar que la transmisión es posible tanto por esporas sexuales como asexuales. Por otra parte hay casos de micovirus, que presentan un porcentaje de infección en ascoesporas que es variable dependiendo del individuo analizado, es el caso de *B. cinerea* con unos porcentajes de micovirus detectados en ascosporas que pueden variar del 35 al 53% (Tan et al., 2007).

La ausencia de transmisión a ascoesporas ha sido observada en algunas especies de hongos, por ejemplo en *Petromyces alliaceus* o *Neosatorya hiratsukae* (Varga et al., 1998), mientras que en el caso de *Magnaporthe grisea* (Chun et al., 1997) la transmisión sexual es muy baja, tan solo se transmite dsRNA al 10% de las ascoesporas. En el

basidiomiceto *Agrocybe aegerita* los micovirus no se transmiten a basidiosporas (Barroso et al., 2000).

En nuestro caso la dispersión de EfV1 y EfV2 dependerá en gran medida del mecanismo de propagación de *E. festucae* en poblaciones naturales de *F. rubra*, que se realiza preferentemente a través de las semillas de la planta, la reproducción del hongo en este caso es de tipo asexual, produciéndose únicamente de forma esporádica la reproducción sexual del hongo (Arroyo García et al., 2002). Esto va a favorecer que *E. festucae* presente poca variación genética dentro de una población, lo que podría facilitar de forma indirecta la asociación de un micovirus a un determinado genotipo. Si esto es así, sería interesante conocer si realmente se produce esta asociación entre los micovirus EfV1 y EfV2 con determinados genotipos del hospedador. Las infecciones de micovirus a menudo son persistentes y asintomáticas, dicha persistencia beneficia al virus. Este tipo de relación con sus hospedadores indica que ambos podrían haber evolucionado conjuntamente con el objetivo común de optimizar su supervivencia.

En vista de la elevada incidencia de los virus EfV1 y EfV2 en poblaciones naturales de *E. festucae*, se planteo estudiar los mecanismos de transmisión de estos virus. En particular, determinar si EfV1 y EfV2 se transmiten a esporas sexuales o asexuales producidas por aislados infectados de *Epichloë festucae*, así como estimar la persistencia de los virus en aislados infectados, tanto en campo como en el laboratorio.

II. Materiales y métodos

Análisis de la transmisión por medio de esporas asexuales

Para estimar la eficiencia de transmisión de EfV1 y EfV2 en *Epichloë festucae* por medio de esporas asexuales (conidios), se analizó la presencia de

los correspondientes dsRNAs en aislados monospóricos producidos a partir de dos aislados infectados: P23, portador de EfV1 y V5, portador de EfV1 y EfV2. La obtención de cultivos monospóricos, se realizó a partir de un cultivo en una placa Petri al que se añadieron 4ml de una solución de Tween 80 al 0.01% en agua y se agitó la placa para facilitar el desprendimiento de conidios; la suspensión obtenida fue centrifugada a 4000g durante 10min para sedimentar los conidios. Se transfirieron alícuotas de diversas concentraciones de conidios a placas Petri con agar de agua y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 24 hrs. Después se observaron las placas en el microscopio para seleccionar conidios germinados con la ayuda de una aguja. De esta manera se obtuvieron 22 cultivos monospóricos del aislado V5 y 42 cultivos monospóricos del aislado P23. Todos los aislados obtenidos fueron analizados por medio de cromatografía en celulosa CF11 para determinar la presencia de RNAbc, indicativo de la presencia de micovirus.

Transmisión por medio de esporas sexuales

Para comprobar si el virus se transmite por medio de las esporas resultantes de la reproducción sexual del hongo (ascoesporas) (Ver figura 6), se realizaron cruzamientos entre aislados de *Epichloë festucae* infectados por EfV1 y/o EfV2 y aislados no infectados por micovirus. Para efectuar estos cruzamientos se fertilizaron estromas reproductivos producidos en plantas de *F. rubra* por dos aislados libres de virus (2210 y 2211) con suspensiones de conidios obtenidas de cultivos de los aislados P23 (portador de EfV1), Se10 (portador de EfV2) y Se33 (portador de EfV1 y EfV2). Estos cruzamientos fueron realizados en el Institute of Integrative Biology (ETH, Zürich) por el Dr. Adrian Leuchtmann. Después de dos o tres semanas el cambio de color blanco a naranja en los estromas fue un indicador del desarrollo y maduración de peritecios y del éxito del cruzamiento.

De los peritecios resultantes de los cruzamientos se obtuvieron ascosporas que fueron plaqueadas en agar con extracto de malta (Leuchtmann et al., 1994). Los cultivos derivados de cada ascospora fueron analizados por medio de cromatografía en celulosa CF11 para comprobar la presencia de RNAbc.

Relación entre la distancia genética y la presencia de virus en aislados de *Epichloë festucae*

Para comprobar si los aislados genéticamente cercanos están infectados por los mismos virus, se analizó la presencia de dsRNA en 18 aislados de la población Palancar cuyas distancias genéticas habían sido estimadas previamente por medio de marcadores moleculares basados en la amplificación de fragmentos de restricción polimórficos (AFLP) (Arroyo et al., 2002).

Si los aislados con mayor similitud, probablemente pertenecientes a un mismo linaje clonal de *E. festucae*, estuviesen infectados por la misma combinación de virus, entonces el resultado podría interpretarse como evidencia de que el o los virus en cuestión son persistentes dentro de linajes clonales existentes en poblaciones naturales de *E. festucae*.

III. Resultados y discusión

Transmisión vertical por esporas asexuales

En cada uno de los 42 cultivos monospóricos derivados del aislado P23, infectado por EfV1 se detectó la presencia del genoma de RNAbc de 5.2 Kpb. Por su parte los 22 aislados monoespóricos derivados de V5, infectados por EfV1 y EfV2, resultaron estar infectados por ambos elementos de RNAbc. Por lo tanto, en ambos aislados se observa que los dos elementos de RNAbc se transmiten a esporas asexuales con una eficiencia del 100%.

En vista de los resultados obtenidos hablaríamos de la pertenencia de EfV1 y EfV2 al grupo de micovirus transmitidos a conidios, y aunque la transmisión a conidios parece ser un proceso común, existe algún caso como el de *Neosatorya hiratsukae* donde pueden producirse conidios no infectados (Varga et al., 1998). Por tanto no parece existir ningún tipo de barrera para la transmisión de EfV1 y EfV2 a conidios y el proceso puede ser considerado muy eficiente, al ser la tasa de transmisión observada en dos aislados del 100%.

Transmisión por esporas sexuales

En ninguno de los aislados derivados de las 17 ascosporas procedentes de cruzamientos entre aislados infectados y libres de virus fue detectada la presencia de virus (Tabla 5). Este resultado indica la existencia de una barrera que impide la transmisión vertical de virus durante la reproducción sexual. No obstante, el cruzamiento recíproco entre un estroma infectado por virus y un aislado donante de conidios libre de virus no ha podido ser realizado al no disponerse de aislados infectados por virus que formen estromas en plantas de *Festuca rubra*.

Tabla 5. Transmisión sexual de los micovirus de *Epichloë festucae*. Resultados del análisis de la presencia de RNAbc en cultivos derivados de ascosporas obtenidas de cruzamientos entre dos aislados libres de virus que formaron estromas en plantas de *Festuca rubra* (2210 y 2211) y aislados infectados por EfV1 (P23), EfV2 (Se10), o ambos virus (Se33).

Cruzamiento	Número de ascosporas obtenidas	Presencia de virus en las ascosporas
2210xSE33	4	negativo
2211xSE33	3	negativo
2211xP23	9	negativo
2211xSE10	1	negativo

Persistencia de RNAbc en aislados de *E. festucae*

Los virus de dsRNA de *Epichloë festucae* han mostrado ser muy persistentes en su hospedador, en el laboratorio se han mantenido aislados infectados durante varios años, con numerosos pases de placa a placa, y nunca se ha perdido un virus de estos aislados. Lo mismo ha sucedido con aislados infectados que han sido almacenados a -20 ó -80°C y han sufrido varios ciclos de congelación y descongelación. Las tasas de 100% de transmisión a conidios del dsRNA observadas en los experimentos anteriores son una prueba más de la gran capacidad de persistencia de EfV1 y EfV2. Esta persistencia ha sido un inconveniente para poder "curar" aislados de virus y obtener aislados isogénicos infectados y libres de virus. Este tipo de material hubiese sido de gran valor para estudiar los efectos de los virus en el hongo huésped.

Al analizar la presencia de RNAbc en aislados de *E. festucae* cuyas distancias genéticas habían sido estimadas con marcadores AFLP (Arroyo et al., 2002), se observó que algunos grupos de aislados genéticamente cercanos estaban infectados por los mismos virus (Figura 11). En particular, todos los miembros de

los dos grupos de aislados más genéticamente similares, los constituidos por los aislados P14, P17, P27 y P29 en un grupo, y por P11, P13 y P31 en el otro, estaban infectados por EfV2. En vista de la distribución de virus que se observa entre individuos de Palancar (Figura 11), podría no deberse al azar que los aislados más similares, que probablemente representen miembros de un linaje clonal de *E. festucae* estén todos infectados por EfV2. Estos aislados genéticamente muy similares fueron obtenidos de distintas plantas y es muy posible que descendan de un mismo aislado que se ha ido diseminando por medio de transmisión clonal por semilla. No es posible asegurar hace cuanto tiempo se han separado estos aislados en distintas plantas, pero este resultado también sugiere que la persistencia de los virus de *Epichloë festucae* es alta en poblaciones naturales.

Figura 11. Relación entre la distancia genética y los virus detectados en aislados de *E. festucae*. Representación de la distancia genética entre 17 aislados de *E. festucae* obtenidos en la población Palancar. La distancia entre los aislados está basada en coeficientes DICE estimados con marcadores AFLP (Arroyo et al., 2002).

IV. Conclusiones

1. La transmisión por conidios de EfV1 y EfV2 se produce con una eficiencia del 100%, convirtiendo a esta ruta en un mecanismo muy eficiente de transmisión y persistencia para ambos micovirus.

2. En ningún caso se observó la transmisión por medio de ascosporas, lo que indica que durante la reproducción sexual existe una barrera que impide la transmisión de ambos virus

3. Los virus EfV1 y EfV2 son muy persistentes en sus hospedadores, además de su elevada tasa de transmisión a esporas asexuales, no se ha observado la pérdida de micovirus en aislados que han estado sujetos a numerosas transferencias y ciclos de almacenamiento en frío en el laboratorio. Esta persistencia también parece suceder en poblaciones naturales, ya que aislados obtenidos de distintas plantas, pero pertenecientes a los mismos linajes clonales están infectados por los mismos virus.

V. Bibliografía

- Arroyo, R., Martínez Zapater, J.M., García Criado, B., Zabalgoeazcoa, I. (2002). The genetic structure of natural populations of the fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Molecular Ecology* 11: 355-364.
- Barroso, G., Labarere, J. (1997). Genetic evidence for non-random sorting of mitochondria in the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4686-4691.
- Brewer, B.J. Fangman, W.L. (1980). Preferential inclusion of extrachromosomal genetic elements in yeast meiotic spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 5380-5384.
- Chu, Y.M., Jeon, J.J., Yea, S.J., Kim, Y.H., Yun, S.H., Lee, Y.W., Kim, K.H. (2002). Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2529-2534.
- Chu, Y.M., Lim, W.S., Yea, S.J., Cho, J.D., Lee, Y.W., Kim, K.H. (2004). Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. *Virus Genes* 28, 135-143.
- Chun, S.J., Lee, Y.H. (1997). Inheritance of dsRNAs in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters* 148, 159-162.
- Cortesi, P., McCulloch, C.E., Song, H., Lin, H., Milgroom, M.G. (2001). Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 159, 107-118.
- Ghabrial, S.A., Nibert, M.L. (2009). Victorivirus, a new genus of fungal viruses in the family Totiviridae. *Archives of Virology* 154: 373-379.
- Ghabrial, S.A., Suzuki, N. (2008). Fungal viruses, p. 284-291. En BWJ Mahy and MHV Van Regenmortel (eds.), *Encyclopedia of Virology*, 3rd ed.

- Ihrmark, K., Johannesson, H., Stenstrom, E., Stenlid, J. (2002). Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genetics and Biology* 36, 147-154.
- Ihrmark, K., Stenstrom, E., Stenlid, J. (2004). Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research*. 108 (2), 149-153.
- Leuchtmann, A. Schardl, C.L., Siegel, M.R. (1994). Sexual compatibility and taxonomy of a new species of *Epichloë* symbiotic with fine fescue grasses. *Mycologia* 86:802-812.
- Melzer, M.S., Dunn, M., Zhou, T., Boland, G.J. (1997). Assessment of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for potential in biological control of chestnut blight. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19, 69-77.
- Pearson, M.N., Beever, R.E., Boine, B., Arthur, K. (2009). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 10(1), 115-128.
- Roca, M.G., Arlt, J., Jeffree, C.E., Read, N.D. (2005). Cell Biology of Conidial Anastomosis Tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 4(5), 911-919.
- Romaine, C.P., Schlaghauffer, B. (1995). PCR analysis of the viral complex associated with La France disease of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2322-2325.
- Smit, W.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (1996). Reduction of laccase activity and other hypovirulence-associated traits in dsRNA containing strains of *Diaphorthe ambigua*. *Phytopathology* 86:1311-1316.
- Suzaki, K., Ikeda, K.I., Sasaki, A., Kanematsu, S., Matsumoto, Yoshida K. (2005). Horizontal transmission and host-virulence attenuation of totivirus in violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. *Journal of General Plant Pathology* 71, 161-168.

- Tan, C.M.C., Pearson, M.N, Beever, R.E, Parkes, S.L. (2007). Why fungi have sex? In: Abstract Book, 14th International Botrytis Symposium, 21-26 October 2007, Cape Town, South Africa p. 26.
- Tsai, P.F., Pearson, M.N., Beever, R.E. (2004). Mycoviruses in *Monilinia fructicola*. *Mycological Research* 108, 907-12.
- Varga, J., Rinyu, F., Kevei, F., Toth, B., Kozakiewicz, Z. (1998). Double-stranded RNA mycovirus in species of *Aspergillus* sections *Circumdati* and *Fumigati*. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 569-574.
- Varga, J., Toth, B., Vagvolgyi, C. (2003). Recent advances in mycovirus research. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 50, 77-94.

Capítulo 3: Efectos fenotípicos de la infección de EfV1 y EfV2

I. Introducción

Dado que todos los micovirus son parásitos obligados es razonable pensar que podrían tener efectos negativos sobre el crecimiento de un hongo o su supervivencia. Sin embargo, en la mayoría de las relaciones micovirus-hospedador que hasta ahora se han estudiado, no se han observado síntomas obvios.

Existe dificultad en asociar un determinado fenotipo a un micovirus en particular, ya que no hay demasiados ensayos que permitan comprobarlo (McCabe et al., 1999); incluso el problema se agrava cuando aparecen infecciones mixtas con más de un micovirus, como es el caso de los virus LIV y MBV en *Agaricus bisporus* (Romaine et al., 1995), o la infección mixta de BVX y BCVF en *Botrytis cinerea* (Howitt et al., 2006).

Pero realmente podría suceder que el fenotipo de un hongo infectado no difiera del que presentan los aislados sanos, debido a que los virus están latentes o suponen un tipo de infección benigna para su hospedador (Boland, 2004). El hecho de que no induzcan ningún cambio fenotípico en determinadas condiciones no implica que no manifiesten un cambio si esas condiciones varían fuera del rango en el que han sido estudiados, estos cambios podrían ser pequeños efectos en el crecimiento del hongo. Esta influencia neutral o estado de latencia podría ser el resultado de la coevolución entre el virus y su hospedador, ya sea por la selección para disminuir la virulencia del micovirus o para aumentar la tolerancia o resistencia del hongo hospedador (Rosewich et al., 2000; Milgroom, 1999). Podría prevalecer la necesidad de tener un hospedador en detrimento de aumentar la virulencia con lo que la evolución podría llegar a seleccionar virus sin síntomas aparentes y ventajosos para el hospedador (McCabe et al., 1999).

Existen micovirus en patógenos de plantas cuyos efectos son una disminución de la patogenicidad o hipovirulencia y crecimiento del hongo. Un ejemplo son los virus que causan hipovirulencia en el hongo *Chryphonectria parasítica*, agente causal de la enfermedad del chancro del castaño (Nuss, 1992). En otros hongos patógenos los efectos negativos producidos por los micovirus afectan negativamente a la velocidad de crecimiento e impiden la esporulación del hongo, como ocurre en *Diaporthe perijuncta* (Moleleki et al., 2003).

Existen algunos micovirus que realmente son beneficiosos para su hospedador, como es el caso del micovirus *Ustilago maydis* virus H1 en *Ustilago maydis*, o el virus L-A en la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, en ambos casos los aislados infectados producen un fenotipo asesino generando toxinas proteicas extracelulares (análogas a las bacteriocinas) a las que son inmunes (Tavantzis, 2002). En otros casos hay interacciones aún más complejas produciéndose un beneficio incluso para el hospedador del hongo, es el ejemplo de *Curvularia thermal tolerance virus* (CThTV) que es indirectamente responsable de que un endofito pueda sobrevivir, ya que las plantas infectadas por endofitos a su vez infectados por el micovirus pueden crecer en suelos cercanos a fuentes termales donde las temperaturas son muy elevadas (Márquez et al., 2007).

El objetivo de éste capítulo es determinar si la presencia de micovirus produce algún cambio fenotípico en aislados de *Epichloë festucae*. Para esto se valoró como el virus afecta el crecimiento radial y la respuesta a alta temperatura del hongo, así como el efecto de la temperatura de incubación sobre la concentración celular del micovirus.

II. Materiales y métodos

Crecimiento radial

La forma ideal de determinar el efecto de los micovirus sería utilizando un mismo aislado infectado y libre de virus, pero como se ha mencionado en el capítulo anterior, los virus de *E. festucae* son muy persistentes y no fue posible "curar" de virus un aislado, por lo tanto para hacer las comparaciones se han utilizado distintos aislados infectados por uno, dos, o ningún virus.

Para determinar si la infección vírica afecta el crecimiento radial *in vitro* de *E. festucae*, se realizaron dos experimentos independientes. En el primero se examinaron 9 aislados: tres sin virus (P9, P12, P30), tres infectados por EfV2 (P13, P20, P32) y tres infectados por EfV1 y EfV2 (P1, P4, P26). Se sembró un pequeño bloque de aproximadamente 1mm² de micelio de cada aislado en cinco placas Petri de 9 cm de diámetro con PDA que se mantuvieron a temperatura ambiente y se midió el diámetro de cada placa al cabo de 15 y 22 días. Para medir el diámetro de los cultivos se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro de cada colonia y se obtuvo la media de estas dos medidas para cada placa.

En el segundo experimento se analizó el crecimiento de 24 aislados obtenidos en las poblaciones de Palancar y Servández: ocho aislados sin virus (S2, S19, S24, S39, P5, P9, P12, P30), ocho infectados por EfV2 (S4, S6, S15, S33, P1, P4, P16, P26) y otros ocho infectados por EfV1 y EfV2 (S3, S27, S30, S40, P7, P13, P20, P32). Todos los aislados del primer experimento, provenientes de la población Palancar se incluyeron en este segundo experimento. Se prepararon 6 réplicas de cada aislado en placas de PDA según el método antes descrito, y el diámetro de cada cultivo se midió a los 15, 21 y 31 días.

Las posibles diferencias en crecimiento entre los distintos aislados (efecto aislado) y entre aislados libres de virus, infectados por un virus, o por

dos virus (efecto virus) se analizaron por medio de un análisis de varianza en cada fecha.

El cálculo del crecimiento radial diario se efectuó según la fórmula:

$$CRD = (D-1) / d$$

donde:

CRD es el Crecimiento Radial Diario en mm.

D es el diámetro medido en mm.

d son los días de crecimiento en los que se tomaron las medidas.

Además estos mismos datos también proporcionaron la velocidad de crecimiento radial (K_r), donde $K_r = R_1 - R_0 / t_1 - t_0$. Donde R_1 es el radio a un tiempo t_1 y R_0 es el radio del aislado en tiempo inicial (t_0).

Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Epichloë festucae*

Para determinar si a diferentes temperaturas se observaban diferencias entre aislados infectados y libres de virus, se incubaron a 20°C, 32°C y 37°C nueve aislados de *E. festucae*: tres libres de virus (P9, P12, P30), tres infectados por EfV2 (P13, P20, P32) y otros tres infectados por EfV1 y EfV2 (P1, P4, P26). Se sembraron cinco réplicas de cada aislado sobre láminas de celofán estéril en placas de PDA y se incubaron a las temperaturas correspondientes durante 8 semanas. Tras este periodo los cultivos se despegaron del celofán y se pesaron juntas todas las muestras de cada aislado antes y después de ser liofilizadas.

Efecto de la temperatura en la concentración celular de RNAbc

Para comprobar si la cantidad de partículas de virus presentes en un aislado es afectada por la temperatura de incubación, se cultivaron a 20 y 32°C dos aislados de *E. festucae* infectados por EfV1 y EfV2 (V5 y P26), uno infectado por EfV2 (P11) y otro infectado por EfV1 (P23). Después de un periodo

de ocho semanas el micelio fue liofilizado y se extrajo dsRNA de las muestras de cada aislado. Para estimar la concentración de dsRNA a cada temperatura las extracciones de dsRNA se realizaron a partir de muestras del mismo peso de micelio liofilizado.

III. Resultados y discusión

Efecto de la presencia de virus en el crecimiento de aislados

En los dos experimentos en los que se midieron los diámetros de una serie de aislados de *Epichloë festucae* libres de virus, infectados por EfV2, o infectados por EfV1 y EfV2 se observó que el crecimiento de los aislados libres de virus fue mayor que el de los infectados por virus.

En el primer experimento no se observaron diferencias significativas entre los diámetros de distintos aislados, pero si fue estadísticamente significativa la diferencia de diámetro entre el grupo de aislados libres de infección y los de los aislados infectados por EfV2 o por ambos virus, que fueron similares (Tablas 6-7).

En el segundo experimento se confirmó esta diferencia, siendo también significativamente mayor el crecimiento de los aislados libres de virus (Tablas 8-9). En este experimento también se detectó una diferencia significativa entre los tres tipos de aislados a los 15 y 31 días, ya que el crecimiento de los aislados infectados por un virus fue significativamente mayor que el de los infectados por dos virus. Es posible que este efecto, no detectado en el primer experimento, se haya detectado al incluir mas aislados en el segundo experimento.

Aunque la presencia de virus en hongos no es un hecho aislado (Herrero et al., 2009), en la mayoría de los casos estudiados no ha sido posible asociar un

fenotipo a la presencia de micovirus en hongos. El hecho de que la infección vírica afecte negativamente el crecimiento radial *in vitro* de *E. festucae* es una observación que no es común dentro de la virología de hongos.

Tabla 6. Experimento 1: Diámetro medio de nueve aislados de *Epichloe festucae* libres de virus, infectados por EfV2, o infectados por EfV1 y EfV2 tras dos periodos de incubación a temperatura ambiente. En las medias de los diámetros de cada grupo las letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de cada periodo de incubación (LSD; $p < 0.05$).

Tipo de infección	Aislado	Diámetro del cultivo	
		15 días	22 días
Sin virus	P9	25.4	43
	P12	24.4	38.8
	P30	27.2	43
	media	25.7 ^a	41.6 ^a
EfV2	P13	21.2	34
	P20	19.2	35.2
	P32	23.6	36.2
	media	21.3 ^b	35.1 ^b
EfV1 +EfV2	P1	20.8	34.8
	P4	23.4	37.4
	P26	20.8	35.2
	media	21.7 ^b	35.8 ^b

Tabla 7. Experimento 1: Análisis de varianza de los datos de crecimiento radial de aislados infectados por uno o dos virus y libres de infección. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ^{ns} no significativo.

Periodo de crecimiento	Efecto	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
15 días	Aislados	8	33.2055	1.5040 ^{ns}
	Virus	2	87.2222	3.9507*
	Error	36	22.0778	
22 días	Aislados	8	58.7555	2.0315 ^{ns}
	Virus	2	189.756	6.5609**
	Error	36	28.9222	

Tabla 8. Experimento 2. Diámetro medio de aislados libres de virus, infectados por EfV2, o por EfV1 y EfV2 tras 15, 21 y 31 días de incubación a temperatura ambiente. Los aislados provienen de dos poblaciones: Servadez (S) y Palancar (P). En cada columna las letras diferentes indican diferencias significativas entre medias ($LSD < 0,05$),

Tipo de infección	Aislado	Diámetro del cultivo					
		15 días	Media	21 días	Media	31 días	Media
Sin virus	S2	2.52	2.11	3.59	2.94	5.53	4.48
	S19	2.17		3.13		4.92	
	S24	1.56		2.12		3.07	
	S39	2.18		2.94		4.42	
	P5	2.12	2.22	3.22	3.29	4.85	4.91
	P9	2.39		3.53		5.21	
	P12	2.17		3.17		4.66	
	P30	2.21		3.25		4.93	
	media:	2.17 ^a		3.12 ^a		4.70 ^a	
Infectados por EfV2	S4	2.42	2.09	3.48	3.17	5.01	4.62
	S6	2.68		3.85		5.40	
	S15	1.73		2.51		3.61	
	S33	1.55		2.84		4.46	
	P1	2.13	2.01	3.02	2.98	4.71	4.50
	P4	1.89		2.87		4.27	
	P16	2.2		3.21		4.70	
	P26	1.83		2.82		4.33	
	media	2.05 ^b		3.07 ^a		4.56 ^b	
Infectados por EfV1 y EfV2	S3	1.64	1.76	2.33	2.62	3.60	4.01
	S27	2.2		3.36		5.05	
	S30	1.5		2.23		3.54	
	S40	1.71		2.58		3.84	
	P7	2.07	2.01	2.97	2.95	4.41	4.38
	P13	1.46		2.06		3.04	
	P20	2.58		3.75		5.52	
	P32	1.96		3.02		4.55	
	media	1.89 ^c		2.79 ^b		4.19 ^c	

Tabla 9. Experimento 2. Análisis de varianza de los datos de crecimiento radial de distintos aislados de *Epichloë festucae* infectados por virus o libres de infección. ** diferencia significativa con $P < 0.01$.

Periodo de crecimiento	Efecto	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
15 días	Aislados	23	0.7399	29.4075**
	Virus	2	1.8445	36.6532**
	Error	119	0.025162	
21 días	Aislados	23	1.4519	85.2756**
	Virus	2	1.5124	88.8292**
	Error	118	0.01703	
31 días	Aislados	23	2.9439	116.0246**
	Virus	2	3.1649	124.7370**
	Error	113	0.0254	

Figura 12. Experimento 2: Crecimiento radial de los distintos aislados (sin virus, con un virus o con dos) después de distintos periodos de crecimiento.

Uno de los motivos por los que sería deseable comparar material isogénico infectado y libre de virus es porque los resultados obtenidos al comparar algunos genotipos fúngicos infectados con otros libres de virus indican que la presencia de EfV1 y EfV2 no afecta de manera extrema el crecimiento de aislados de *E.*

festucae. Prueba de ello es que en ambos experimentos de crecimiento se observaron rangos de variación entre grupos de aislados que fueron similares y se solaparon. Por ejemplo, a los 21 días el rango de medidas observadas en aislados sin virus fue de 2.12 a 3.59 cm; en aislados infectados por EfV2 de 2.51 a 3.85 cm y en aislados infectados por ambos virus de 2.23 a 3.75 cm (Tabla 8). Esto indica que probablemente el efecto del virus varía según el genotipo del hongo infectado.

El hecho de que los virus de *Epichloë* no afecten excesivamente el crecimiento de su huésped, junto con su persistencia, eficiente transmisión y elevada incidencia en poblaciones naturales indican que estos virus conviven en situación similar a un equilibrio con su hospedador.

Aunque los resultados de ambos experimentos muestran que en las condiciones del estudio, la infección vírica afecta el crecimiento in vitro de aislados de *E. festucae*, en ciertas circunstancias los virus EfV1 o EfV2 podrían ser beneficiosos para su huésped. Recientemente se ha observado que un micovirus puede ser beneficioso para un hongo, es el caso ya mencionado de *Curvularia thermal tolerance virus* (CThTV) que permite el crecimiento de la planta y el endofito al que infecta en suelos a elevadas temperaturas (Márquez et al., 2007).

En algunas fechas del segundo experimento (15 y 31 días, Tabla 8) se detectó una diferencia significativa entre el crecimiento de aislados infectados por uno o dos virus, siendo menor el crecimiento de aislados infectados por ambos virus que el de los infectados por EfV2. Aunque no se ha estimado el número de partículas de virus que podría haber en cada célula de *Epichloë festucae*, según se puede observar en fotografías de extractos de dsRNA obtenidos a partir de cantidades relativamente pequeñas de micelio, la concentración celular de virus es elevada (Figuras 8, 10 y 16). Adicionalmente, la

cantidad de dsRNA de EfV1 es siempre mayor que la de EfV2. Por lo tanto, es posible que el menor crecimiento observado en aislados infectados por ambos virus sea el resultado de un mayor grado de parasitismo. No obstante, el hecho de no disponer de más aislados infectados solo por EfV1 limita el conocimiento acerca de la influencia que tendría realmente este micovirus sobre el crecimiento radial.

En el segundo experimento se detectaron diferencias significativas entre los distintos aislados analizados según su población de origen. Al analizar las diferencias de crecimiento entre los aislados de Palancar y Servández, el diámetro medio de los aislados de Palancar fue significativamente mayor ($P < 0.01$) que el de los de Servández en las tres fechas analizadas (Tablas 10 y 11). Existen diferencias genéticas entre los aislados de Palancar y Servández, los aislados de cada población son genéticamente mas similares entre si que con los de la otra población (Arroyo et al., 2002). Por lo tanto, la mayor tasa de crecimiento parece ser una característica particular de los genotipos de la población de Palancar.

Tabla 10. Experimento 2. Diámetro medio de los aislados de las dos poblaciones de estudio a los 15, 21 y 31 días tras la siembra, En cada periodo de tiempo las letras diferentes indican diferencias significativas entre medias (LSD; $p < 0.05$).

Población	Diámetro medio de los cultivos		
	15 días	21 días	31 días
Palancar	2.08a	3.08a	4.60a
Servández	1.99b	2.91b	4.37b

Tabla 11. Experimento 2. Análisis de varianza de los datos de crecimiento de 24 aislados de *E. festucae* pertenecientes a las poblaciones de Servández y Palancar. ** diferencia significativa con $P < 0,01$.

Periodo de crecimiento	Efecto	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
15 días	Aislados	23	0.7399	29.4075**
	Localidad	1	0.330750	13.1449**
	Error	119	0.025162	
21 días	Aislados	23	1.451914	85.2756**
	localidad	1	0.92071	54.0763**
	Error	118	0.017026	
31 días	Aislados	23	2.943868	116.0246**
	Población	2	1.73547	68.3989**
	Error	113	0.025373	

Si se analizan los valores de la velocidad de crecimiento a lo largo del tiempo (Figura 13) se observa en los tres grupos de aislados la misma tendencia de aumento y disminución de la velocidad en todas las variantes en los días que se llevan a cabo las medidas. Estas fluctuaciones, que pueden ser debidas a diferentes causas; se podrían interpretar como que el virus no altera el proceso de desarrollo habitual del hongo (todos siguen las mismas tendencias), lo único que modifica es el tiempo empleado en su desarrollo; este resultado muestra que el comportamiento del virus produce un retardo en el crecimiento del hongo que no supone un perjuicio en su desarrollo final.

Figura 13 Velocidad de crecimiento radial ($\mu\text{m}/\text{hora}$) de tres grupos de aislados. Se observa la misma tendencia de comportamiento en la velocidad para todos los aislados. Las medidas realizadas durante los días 21 a 26, muestran que el crecimiento radial no experimenta una gran variación durante el proceso de crecimiento probablemente.

Efecto de la temperatura de incubación en la concentración celular de virus

A una temperatura de 37°C no sobrevivió ningún aislado, por lo que la temperatura máxima a la que se incubaron los aislados fue de 32°C . Al incubar el mismo aislado a 20° y 32°C se observó que la concentración celular de dsRNA del genoma de EfV1 aumenta a temperatura elevada; este fenómeno sucedió tanto en un aislado infectado solo por EfV1 (P23) como en otros dos infectados por ambos virus (V5 y P26) (Figura 14). Sin embargo, este efecto de la temperatura de incubación no fue evidente en la concentración del virus EfV2; ni en el aislado P11 infectado solo por este virus, ni en V5 y P26, coinfectados con EfV1.

Aunque no se ha cuantificado la diferencia entre la concentración de dsRNA de EfV1 a 20 y 32°C , por lo que se observa en las fotografías de la electroforesis de este experimento (Figura 14) parece haber al menos el doble de dsRNA a la temperatura superior.

Los virus como EfV1 y EfV2, que no producen síntomas obvios en micelio infectado es muy posible que de alguna manera tengan regulado el número de copias presentes en células del hospedador. Los resultados de estos experimentos indican que en el caso de EfV1 el número de copias de virus en cada célula es afectado por el incremento de temperatura, aumentándose su concentración.

Figura 14. Electroforesis de extractos de RNAbc obtenido de pesos equivalentes de micelio de cuatro aislados (P23 infectado con EfV1; V5 y P26, infectados por EfV1 y EfV2, P11 infectado por EfV2) de *E. festucae* incubados a 20 y 32°C en dos experimentos diferentes. En el carril M está el marcador que indica el tamaño de las bandas,

Hemos visto que a 32°C los aislados V5, P26 y P11 disminuyen su biomasa al 28, 23 y 53% del peso observado a 20°C (Figura 14 Y 15). Precisamente los aislados que disminuyen más su proporción son los que contienen conjuntamente EfV1 y EfV2, y por tanto la pérdida de producción podría tener relación con la mayor concentración del micovirus.

Efecto de la temperatura de incubación en la biomasa

El objetivo de este experimento fue comprobar si a temperaturas de incubación elevadas la presencia de los virus afectaba la producción de biomasa de *Epichloë festucae*. Los datos obtenidos en este experimento (Tablas 12 y 13) mostraron que a 20°C, el peso medio de los aislados libres de virus fue superior al de los infectados ($F= 6,5969$; $p<0.05$), tal como se observó en los experimentos de crecimiento radial, aunque el peso de aislados infectados por ambos virus fue superior que el de los infectados solo por EfV2.

Sin embargo, aunque la diferencia entre aislados infectados o libres de infección no fue estadísticamente significativa a 32°C ($F= 1.7885$, n.s.) el peso de los aislados infectados por ambos virus fue superior al de los aislados libres de virus o infectados solo por EfV2.

Aunque este experimento indica que la infección vírica podría ser beneficiosa para el hongo a temperatura elevada, no se dispone de suficientes repeticiones de cada aislado para hacer un análisis estadístico fiable, esto se debe a que se pesaron juntas todas las muestras de cada aislado y para el análisis estadístico se agruparon los aislados según su tipo de infección.

Tabla 12: Peso (g) de las diferentes aislados de *E. festucae* pertenecientes a la población de Palancar, incubados sobre celofán en PDA a diferentes temperaturas; (20° y 32°C). Las letras indican diferencias significativas entre medias (LSD; $p < 0,05$).

Presencia de virus	Aislado	Temperatura de incubación			
		20° C		32° C	
		Peso fresco	Peso seco	Peso fresco	peso seco
Sin virus	P9	2.12	0.48	0.41	0.06
	P12	1.55	0.29	0.60	0.11
	P30	2.55	0.49	0.72	0.16
	media	2.07	0.42a	0.58	0.11a
EfV2	P13	0.39	0.09	0.27	0.03
	P20	1.45	0.27	0.90	0.16
	P32	0.27	0.06	0.25	0.02
	media	0.70	0.14b	0.47	0.07a
EfV1+EfV2	P1	1.18	0.30	0.64	0.14
	P4	2.36	0.39	0.69	0.13
	P26	1.65	0.31	1.06	0.22
	media	1.73	0.33a	0.80	0.16a

Tabla 13. Análisis de varianza de una vía de los pesos secos a 20 y 32 C° de aislados de *E. festucae* pertenecientes a la población de Palancar.

Efecto	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
Infección 20°	2	0.06164	6.5969*
Infección 32°	2	0.0065	1.7885 ^{ns}

En los aislados sin virus el incremento de la temperatura tiene un mayor efecto sobre el crecimiento del aislado, disminuyendo esa diferencia de forma más notable cuando hay virus (Figura 15). Por lo tanto, es posible que a temperaturas elevadas la infección vírica pueda ser favorable para *E. festucae*.

Figura 15. Efecto de la temperatura en el peso fresco de aislados de *E. festucae* incubados a temperaturas de 20° y 32°C.

En la valoración del contenido de agua de los aislados a diferentes temperaturas existen diferencias (Figura 16). Los aislados infectados por EfV2 mostraron un contenido de agua a 32°C relativamente mayor que el de los otros dos grupos.

Figura 16. Contenido de agua de los aislados de *E. festucae* a las diferentes temperaturas de incubación.

IV. Conclusiones

1. Aunque existe una variabilidad notable entre aislados de *E. festucae* respecto a su crecimiento radial, se observó mayor crecimiento en aislados libres de virus. La presencia de una infección mixta produce una disminución algo mayor del crecimiento radial que simplemente la presencia de EfV2.
2. La concentración celular de EfV1 aumenta cuando el hongo es incubado a 32°C, sin embargo este efecto de la temperatura no se observó en el virus EfV2.
3. Aunque a una temperatura de 20°C los aislados libres de virus producen mas biomasa que los infectados, a 32°C la producción de biomasa fue mayor en aislados infectados por ambos virus que en aislados libres de virus o infectados por EfV2.

V. Bibliografía

- Arroyo, R.; Martínez Zapater, J.M.; García Criado, B., Zabalgoeazcoa, I. (2002). The genetic structure of natural populations of the fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Molecular Ecology* 11, 355-364.
- Boland, G.J. (2004). Fungal viruses, hypovirulence, and biological control of *Sclerotinia* species. *Canadian Journal of Microbiology* 26, 6-18.
- Herrero, N., Sánchez, S., Zabalgoeazcoa, I, (2009). Mycoviruses are common among different species of fungal endophytes of grasses. *Archives of Virology* 154:327-330.
- Howitt, R.L.J., Beever, R.E., Pearson, M.N., Forster, R.L.S. (2006). Genome characterization of a flexuous rod-shaped mycovirus. *Botrytis virus X*, reveals high amino acid identity to genes from plant potex-like viruses. *Archives of Virology* 151, 563-579.
- Márquez, L.M., Redman, R.S., Rodríguez, Roossinck, M.J. (2007). A virus in a fungus in a plant, Three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315 (58119), 513-515.
- McCabe, P.M., Pfeiffer, P., Van Alfen, N.K: (1999). The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends of Microbiology* 7, 377-381.
- Milgroom, M.G. (1999), Viruses in fungal populations. In *Structure and dynamics of fungal populations*. Edited by J.J, Worrall, Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 283-305.
- Moleleki, N., Van Heerden, S.W., Wingfield, M.J., Wingfield, D., Preisig, O. (2003). Transfection of *Diaporthe perijuncta* with *Diaporthe* RNA Virus. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3952-3956.

-Nuss, D.L. (1992). Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological Reviews* 56, 561-576.

Capítulo 4: Caracterización molecular de EfV1

I. Introducción

- **Posible estructura del genoma de EfV1**

Después de haber estudiado aspectos como la incidencia, la transmisión y los cambios fenotípicos generados por la presencia de EfV1 y EfV2 en *E. festucae*, llega el momento de realizar un estudio molecular de los virus. El objetivo de esta parte de la tesis es obtener la secuencia completa del genoma de EfV1, un virus frecuentemente encontrado en aislados de *E. festucae* en infecciones mixtas junto con EfV2. Algunos resultados obtenidos en los estudios previos a este capítulo, indican que EfV1 podría ser un miembro de la familia *Totiviridae*.

EfV1 está encapsidado y su genoma es una molécula de aproximadamente 5 kbp de RNAbc (Zabalgogezcoa et al., 1998), debido a lo cual podría contener al menos dos genes que codifiquen dos proteínas: posiblemente una RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) y una proteína de la cápsida (Cp).

- *Proteína de cápsida*

Los virus de RNAbc son un grupo muy diverso, pero en general comparten principios arquitectónicos y numerosas características funcionales. Una característica que distingue a los virus de ARN bicatenario, independientemente de la familia a la que pertenezcan, es su capacidad para llevar a cabo la replicación de los segmentos de ARN bicatenario bajo las condiciones apropiadas dentro de la cápsida. En concreto, los virus de hongos, al igual que el resto de virus de RNAbc, tienen una cápsida que está implicada en la replicación del genoma de RNAbc, y en la liberación de la cadena + de RNA. La cápsida va a contener la RdRp y se sabe con certeza que juega un papel importante en el proceso de replicación pero esto aún no ha sido demostrado (Ghabrial, 2008).

Debido a la limitada capacidad codificante de los virus, estos necesitan optimizar sus recursos especialmente cuando han de constituir una partícula viral infecciosa con un número de funciones esenciales, como son el proceso de traducción y replicación del genoma, para las que sólo necesitan una o unas pocas proteínas. Los virus consiguen esto gracias al uso de simetría y al polimorfismo conformacional de proteínas estructurales (Dokland, 2000). La cápsida se va a formar a partir de subunidades proteicas asimétricas, que se disponen de forma simétrica para obtener una estructura estable con una energía libre mínima, lo que se consigue con el máximo número de enlaces no covalentes. Por esta razón los virus encapsidados se dividen en diferentes morfologías según las disposiciones simétricas posibles: helicoidal, isométrica y baciliforme.

Diversos virus, carentes de una relación entre ellos, pueden poseer cápsidas construidas de una forma similar. De hecho algunas proteínas de virus pertenecientes a diferentes géneros, pueden presentar una similitud no significativa a nivel de secuencia, pero patente al tratarse de estructuras secundarias y terciarias; esto es debido a que la estructura primaria es perdida en un cambio evolutivo de forma mas rápida a como lo harían las estructuras secundaria o terciaria de las proteínas y también puede ser el resultado de evolución convergente hacia la misma forma; este tipo de similitud se ha observado en proteínas de virus con genomas de RNA y con un tamaño de partícula de aproximadamente 30nm (Rossmann, 1989). En una comparativa realizada entre virus, se ha observado que no solo comparten similitudes en su forma de replicación, sino que comparten propiedades bioquímicas y estructurales (Mertens, 2004); a pesar de que a priori las proteínas que forman parte de la cápsida se han ido adaptando a las necesidades requeridas en sus hospedadores, lo que conlleva que presenten una mayor diversidad tanto en su secuencia como en su organización estructural.

- *Proteína RNA polimerasa RNA dependiente*

En general casi todos los genes virales que codifican una polimerasa están altamente conservados y probablemente sea esta una razón junto con el interés de entender la enzimología de las DNA y RNA polimerasas por lo que se han realizado un elevado número de estudios filogenéticos con ellas (Koonin, 1993). La RNA polimerasa RNA-dependiente (RdRp) es una enzima altamente conservada en muchas eucariotas, sin embargo no aparece en Bacteria y Archaea (Iyer, 2003). La relación evolutiva entre RdRps y otras polimerasas ha sido estudiada pero no hasta el punto de conocer su origen, que de momento sigue siendo un misterio. Lo que se cree es que las RdRp probablemente han evolucionado antes o más rápidamente que el resto de polimerasas, lo que las ha convertido en proteínas esencial para todos los virus de RNA (Bruenn, 2003).

Las RdRps virales parecen compartir una estructura básica con gran similitud a las encontradas en polimerasas de RNA y DNA. Es más, las RdRps de los virus de RNAbc de eucariotas simples, parecen formar un grupo bien definido como consecuencia directa de presentar semejanzas significativas entre todos sus miembros. Sin embargo a nivel de la secuencia primaria de las RdRps, existen discrepancias en cuanto a su similitud, ya que según algunos autores la similitud únicamente se limita a la presencia de motivos conservados (Bruenn, 1993; Butcher et al., 2001). En estas polimerasas suelen aparecer ocho motivos conservados a nivel de aminoácidos. Inicialmente fueron identificados por Karmer y Argos (1984) varios motivos comunes entre las RdRps de virus animales y de plantas de RNA. Posteriormente se ampliaron tanto el número de motivos como el de RdRps estudiadas, llegando hasta un total de ocho motivos conservados (Koonin, 1991; Poch et al., 1989).

- *Regiones no traducidas (UTRs)*

Es posible que además de las proteínas mencionadas existan en la secuencia nucleotídica de EfV1 regiones terminales que no codifiquen para ninguna proteína, como ocurre en muchos virus y que desempeñen un papel relevante en las funciones del virus. En muchos virus de RNA las UTR en el extremo 3' suponen un sitio de reconocimiento e iniciación para la replicación de RNA (Sriskanda et al., 1996).

En muchos virus de RNA se han encontrado elementos dentro de la región UTR 5' que están implicados en diversos procesos de la infección viral. Por ejemplo varios virus de RNA(+) de plantas y animales contienen estructuras en esta región que facilitan la traducción de las proteínas virales (Gallie, 2001; Guo et al., 2001; Vagner et al. 2001), la replicación del genoma (Andino et al., 1990; Miller et al., 1998; Chen et al., 2001; Mason et al., 2002; Luo et al., 2003) o la transcripción (Van Marle et al., 1999). También se han encontrado en el extremo 5' UTR señales que permiten la unión de la proteína de la capsida, permitiendo así el ensamblaje de la partícula. (Sit et al., 1994; Bink et al., 2002; Sasaki y Taniguchi, 2003).

Adscripción filogenética de EfV1

En general los virus de RNA replican sus genomas con una tasa de error varias veces superior a la de la replicación del DNA. Este hecho es consecuencia de la falta de actividad correctora de las enzimas que copian el RNA vírico (RNA replicasas y transcriptasas inversas) (Lázaro, 2006). Actualmente, se cree que la tasa de error de la copia del material genético es un carácter seleccionable que depende de la variabilidad del ambiente. Los virus tienen que enfrentarse con frecuentes cambios ambientales ya que cada nuevo hospedador supone un cambio en las condiciones en las que debe llevar a cabo su replicación. Como

consecuencia, los virus RNA han potenciado la generación de diversidad genética como estrategia evolutiva, en detrimento del mantenimiento de una alta fidelidad de la copia. La elevada tasa de error de la replicación del RNA vírico es la causa de que prácticamente cada nuevo genoma generado sea diferente del genoma progenitor. Los virus de ARN, tanto de animales como de plantas, son extremadamente sensibles a la mutación, siendo hasta un 50% de las sustituciones nucleotídicas letales para el virus (Cuevas et al., 2009). Estos hechos, unidos al corto tiempo de generación viral y al elevado número de individuos que componen las poblaciones víricas, se traducen en una gran heterogeneidad genética. Una población vírica puede estar compuesta por entre 10^9 y 10^{12} individuos cuyos genomas difieren en uno o varios nucleótidos. Esto constituye un enorme reservorio de variantes que podrán emerger y hacerse mayoritarias cuando las circunstancias ambientales lo requieran.

Una de las limitaciones principales en el estudio de la evolución de los virus es que no se conocen fósiles con los cuales se pueda construir una historia evolutiva, como ocurre con las plantas, vertebrados y otros organismos. Sin embargo, un aspecto importantísimo es que actualmente contamos con las secuencias de sus genomas. La comparación de secuencias procedentes de diferentes especies ha llevado en los últimos años a establecer relaciones evolutivas entre genes virales. Adicionalmente, se ha observado que los análisis comparativos de las secuencias nucleotídicas de los genomas virales, así como de las secuencias de aminoácidos, por lo general confirman el agrupamiento o clasificación tradicional de los virus. Dichas comparaciones han mostrado además homologías inesperadas entre genes de virus de diferentes grupos que habían sido considerados nada o muy poco relacionados entre ellos, así como homologías entre genes virales y no virales. De esta manera, por medio de análisis

comparativos de secuencias de los virus que existen actualmente, podemos inferir algunas propiedades y características de sus ancestros.

El análisis comparativo de secuencias muestra similitudes inexplicables entre virus de RNA y entre proteínas virales y celulares, indicando la existencia de relaciones entre los virus de RNA y entre estos y organismos con genomas de DNA, como ocurre en el caso de las polimerasas, donde aparecen vínculos con otros virus de RNA y DNA (Bruenn, 2003).

Como ya hemos dicho, las filogenias no solo ofrecen un esquema visual de clasificación, sino que tienen multitud de usos. Existen factores evolutivos tales como la selección natural, la deriva genética y la historia demográfica de las poblaciones, que dejan diferentes huellas en las relaciones evolutivas entre las secuencias representadas en una filogenia. Por ello, un análisis exhaustivo de un árbol filogenético puede descifrar cuales de los procesos anteriores han actuado. De esta forma este capítulo no solo va a limitarse a un estudio de las características moleculares del virus EfV1, sino que también se va llevar a cabo un estudio filogenético que corrobore la hipótesis de que EfV1 pertenece a la familia *Totiviridae*. La evolución de los virus de RNA de la familia *Totiviridae* parece ser muy interesante puesto que los miembros de esta familia están presentes tanto en hongos como en protozoos. Todo esto puede ser un claro indicador de que toda la familia vendría de un ancestro común que podría haber infectado una sola célula tipo precursora de ambos, antes de la divergencia entre hongos y protozoos (Bruenn 1993).

II. Materiales y métodos

Extracción de RNAbc, clonación y secuenciación

Inicialmente se realizó una extracción de RNAbc partiendo de micelio del aislado 23-11, el único aislado que contiene únicamente EfV1, según el método descrito en el primer capítulo. A continuación se llevó a cabo una precipitación de los extractos de RNAbc con una concentración final de LiCl 5M. para la precipitación selectiva del RNA (Cheng et al., 2003). Los RNAs grandes (RNAr, RNAm y RNAbc) son insolubles en alta fuerza iónica, mientras que RNAs pequeños (tRNA) y el DNA siguen siendo solubles. La muestra se mezcló vigorosamente y se incubó a -20° durante 24h. El precipitado fue sedimentado por centrifugación y el proceso de precipitación fue repetido de nuevo, para dejarlo finalmente resuspendido en H₂O tratada con DEPC para la posterior síntesis de cDNA. Se valoró la cantidad, la pureza y el tamaño de RNAbc obtenido por medio de electroforesis en gel de agarosa.

El segundo método empleado en la extracción de RNAbc se utilizó a posteriori para disponer de RNAbc molde para obtener cDNA de algunas de las regiones que presentaban mas dificultad para obtenerse. En este caso la extracción se realizó empleando TRI REAGENT (Sigma) (mezcla de fenol y isotiocianato de guanidina) para la extracción de RNA total; (mRNA y ssRNA). A 50-100mg de micelio pulverizado se añadió 1ml de TRI reagent, para a continuación realizar una separación del RNA con la adición de cloroformo. El RNA fué precipitado con isopropanol y lavado con etanol al 75%. Finalmente el RNA se resuspendió en H₂O tratada con DEPC y fue tratado con 5U de DNasa I durante 30 minutos a 37°C, con una posterior precipitación con LiCl 5M resuspendiéndose de nuevo en agua con DEPC dejándolo listo para una posterior RT-PCR.

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA se empleó el KIT "Superscript double-stranded cDNA synthesis" (Invitrogen), modificandose el proceso de desnaturalización. La cantidad de RNAbc de partida fue aproximadamente de 2µg, a los que fueron añadidos aproximadamente 1µg de oligonucleótidos al azar (con tamaños de 9 o 11 nucleótidos). Las moléculas de RNA podrían resultar dañadas durante el proceso de desnaturalización al ser calentadas a 95° C durante un tiempo mayor a 5 minutos. Como alternativa también se empleó un agente desnaturalizante; DMSO (Dimetilsulfoxido) en una concentración del 20% antes de que el RNA fuera calentado a 70°C durante 10 min con un enfriamiento en nitrógeno líquido durante 2-3min. El RNA bicatenario puede poseer potentes estructuras secundarias que podrían interferir con la polimerasa que lleva a cabo la síntesis de la cadena de cDNA, o bien la existencia de regiones ricas en GC puede producir una ineficiente separación de las dos cadenas de RNA, por lo que la presencia de DMSO en el proceso de desnaturalización interfiere en la formación de enlaces de hidrógeno entre ambas cadenas minimizando así el reanillamiento de ambas cadenas de RNA.

Después de la desnaturalización la síntesis de cDNA fue llevada a cabo con el "SuperscriptTM double-stranded cDNA síntesis kit" según el protocolo del fabricante. Tras la síntesis de fragmentos de cDNA de doble cadena se añadió un residuo de adenosina en los extremos empleando Taq polimerasa y dATP durante 30min a 72°C (Promega, Madison, WI, USA). El residuo es añadido para generar un extremo 3' cohesivo que sirva como punto de ligamiento posterior al vector de clonación. Éste cDNA se filtró en una columna de Sephadex G-50 (Invitrogen, Carlsbad, CA), con la finalidad de hacer una selección de los fragmentos con tamaño igual o superior a 500pb. Finalmente se realizó una precipitación con etanol al 70% para dejar resuspendido el cDNA en 3µl de agua tratada con DEPC.

Los fragmentos de cDNA resultantes fueron ligados al vector Pgem T easy de acuerdo con lo establecido en el correspondiente protocolo (Promega, Madison, WI, USA) para proceder a su clonación. Las células de *Escherichia coli* JM109, fueron transformadas con el vector recombinante previamente obtenido. Posteriormente se realizó la selección de las colonias cuyo plásmido contiene un inserto de cDNA. De todas las colonias preseleccionadas se realizaron minipreparaciones de sus plásmidos por medio de PCR (Robles, 1994), y los productos PCR obtenidos fueron secuenciados.

Los clones de cDNA se ensamblaron con el programa Seqman del paquete DNASTAR. Los fragmentos ensamblados de mayor tamaño fueron empleados para el diseño de oligonucleótidos en sus extremos (Tabla 13), con objeto de completar las regiones existentes entre ellos por medio de RT-PCR y unir los distintos fragmentos; para llevar a cabo éste proceso también fueron empleados los dos métodos de desnaturalización del RNAbc comentados anteriormente, tras lo cual fue realizada una transcripción inversa en la que se empleó transcriptasa inversa Superscript II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA) con uno de los oligonucleótidos previamente diseñados para el extremo 3' (Tabla 13), obteniéndose así una cadena de cDNA a partir de la cual se pudo realizar una PCR. El producto PCR obtenido fue posteriormente secuenciado.

Tabla 13. Oligonucleótidos diseñados para obtener cDNA en las zonas que no fueron inicialmente clonadas entre contigs y los extremos 5' y 3'. En la tabla inferior se indica la posición que ocupa cada uno de ellos en la secuencia total de EfV1.

Primer	Secuencia (5'-3')	Longitud	Posición
Gap1F	ccagcgcggaaggact	17	360
Gap1R	ggccacggcggggacgaga	19	903
Up140	ccctaccaacccctacac	19	2329
Do493	tggtagtcgaatggaagtg	19	2668
Do445	agcagcgcttccaggatc	19	2620
RT5	ccgtaatggcgcccgacctc	20	457
3PCR	ctagcgtatgatgcgtggg agag	24	4917

Para llevar a cabo la clonación de los extremos 3' y 5' del RNAbc se empleó el kit "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends" (Invitrogen, Carlsbad) a partir de RNAbc, siguiendo las instrucciones indicadas en el protocolo, exceptuando nuevamente la desnaturalización, que se realizó con DMSO al 20% y con un posterior enfriamiento en nitrógeno líquido. Se diseñaron de nuevo oligonucleótidos para la consecución de éstos extremos que fueron empleados para llevar a cabo las reacciones de RT y PCR (Tabla 13).

Inicialmente las secuencias obtenidas fueron comparadas con las de la base de datos GENBANK, con el doble propósito de descartar secuencias no pertenecientes a virus que podrían aparecer de fondo en el proceso de clonación, y por otro lado con el fin de determinar el origen vírico del resto de secuencias que fueron tomadas finalmente como válidas.

En todos los casos la secuenciación fue realizada en el Servicio de Secuenciación de DNA de la Universidad de Salamanca. Una vez conseguidas

todas las secuencias parciales de cDNA se realizó un ensamblaje para obtener una secuencia consenso final de cDNA de EfV1

Análisis del genoma de EfV1

2. Búsqueda de ORFs en EfV1

Para determinar la estructura del genoma de EfV1 se buscaron todos los posibles marcos de lectura (ORFs) utilizando el programa ORF finder. Para desvelar la posible función de cada ORF se realizó una búsqueda de secuencias similares a cada ORF en la base de datos, empleándose tanto la secuencia nucleotídica como su traducción en aminoácidos. La búsqueda en la base de datos GenBank se realizó por medio del algoritmo BLAST, basado en la búsqueda de regiones de similitud local (Altschul et al., 1997).

3. Análisis estructural de regiones UTR y zona de unión de los dos ORFs de EfV1

Se realizó un estudio estructural del RNA en dos zonas relevantes: las regiones UTR y la zona de solapamiento de ambos ORFs. Para el estudio de la zona de solapamiento se seleccionó una región de unos 100 nucleótidos en torno al punto de unión de ambos ORFs.

El estudio se realizó mediante predicciones de la estructura secundaria de RNA. La predicción de estructuras secundarias con mínima energía libre se realizó a 37°C utilizando los programas M-fold (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/odl/rna; Zuker et al., 2003), vsFold4 (Dawson et al., 2006) y RNAShapes (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnashapes/submission.html>; Steffen et al., 2006). Para la localización de pseudonudos fue empleado el programa vsFold5 (<http://www.rna.it-chiba.ac.jp/~vsfold/vsfold5/>; Dawson et al., 2007), algoritmo

que realiza un plegamiento secuencial en dirección 5'-3' entre los plegamientos más probables termodinámicamente

Finalmente, una vez obtenidas las estructuras se llevó a cabo una comparación visual entre las estructuras encontradas en EfV1 y otras caracterizadas en otros miembros de la familia *Totiviridae* e incluso en otros virus de RNAbc.

4. Estudio estructural de las proteínas codificadas por el ORF1 y ORF2 en EfV1 por medio de técnicas bioinformáticas

Como única vía para la caracterización de las proteínas presentes en el virus EfV1 se emplearon diversas herramientas bioinformáticas. En general estos métodos se fundamentan en el establecimiento de la similitud existente entre la secuencia de nuestra proteína con otras ya caracterizadas; se ha verificado que las proteínas con más de un 30% de residuos idénticos están relacionadas estructuralmente (Rost et al., 1996). La predicción de la estructura de una proteína siguiendo estos métodos, sigue un proceso progresivo que se irá describiendo a continuación comenzando por un plegamiento estructural básico.

- **Estructura primaria. Propiedades de los residuos**

El conocimiento de la secuencia de aminoácidos es esencial para el estudio de la estructura y función de una proteína. Las características primarias de una secuencia son aquellas que pueden ser representadas por un solo valor asociado a cada aminoácido (Rost, 2001). La información más inmediata que podemos sacar de la secuencia de una proteína son características físico-químicas de sus residuos, tales como hidrofobicidad, polaridad, etc.

Las secuencias primarias de las proteínas se valoraron según sus picos de hidrofobicidad utilizando el método Kyte-Doolittle con un tamaño de ventana de 9 aminoácidos; la técnica que se utilizó calcula en estas ventanas la hidrofobicidad media de cada residuo a partir de los coeficientes de partición de los aminoácidos, lo que es muy útil en la determinación de regiones internas (típicamente hidrofóbicas) o externas (típicamente hidrofílicas) de las proteínas.

Hay varias herramientas que calculan este tipo de parámetros a partir de la secuencia de aminoácidos. En éste trabajo fué empleado el programa Proscale de ExPasy (Gasteiger et al., 2003) que permitió calcular tanto el perfil hidrofóbico como el de flexibilidad partiendo de la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas.

- **Estructura Secundaria de las proteínas de EfV1**

La predicción de la estructura secundaria de las proteínas se realizó partiendo de sus secuencias de aminoácidos. La estructura secundaria se genera como producto de las interacciones que se forman entre los diversos residuos de forma espontánea y que fundamentalmente son puentes de hidrogeno entre grupos carbonilos y NH. La mayoría de métodos que se emplearon usan redes neuronales u otros algoritmos que utilizan otras proteínas de estructura secundaria conocida como referencia, para pasar posteriormente a la predicción. Muchos de estos métodos van a usar información adicional proveniente, por ejemplo, de alineamientos múltiples y van a permitir calcular la accesibilidad real de cada residuo al solvente.

Se realizó una búsqueda previa de secuencias homólogas por medio de BLASTX y BLASTP que proporcionó parte de la información necesaria para iniciar el estudio del plegamiento de las proteínas.

Además se buscaron también homólogos remotos (20-30%) usando el algoritmo PSI-BLAST (Atschul et al., 1997) basado en la construcción de perfiles numéricos a partir de búsquedas simples de BLAST.

Los métodos que se utilizaron para la predicción de estructura secundaria fueron:

-PROF (Rost, 2001)

Es un algoritmo de predicción de estructura secundaria y de accesibilidad del disolvente. Emplea un sistema de redes neuronales basado en perfiles contruidos a partir de un alineamiento múltiple, generado por Maxhom según los resultados obtenidos por una búsqueda en PSIBLAST, y otras características de los residuos obtenidas de bases de datos. Fiabilidad de ~70%.

-PSIPRED (Jones, 1999)

Algoritmo de predicción de estructura secundaria a partir de un sistema de redes neuronales combinado con un alineamiento múltiple generado automáticamente a partir de los resultados obtenidos por una búsqueda con PSIBLAST. Hay que destacar que el método selecciona los resultados eliminando las proteínas extrañas no relacionadas con el perfil. Fiabilidad >76%.

-JPRED (Cuff et al. 1998)

Método que combina los resultados de distintos programas de predicción de estructura secundaria y a partir de éstos genera un consenso. La predicción es realizada sobre un alineamiento múltiple que se genera automáticamente por CLUSTALW a partir de los resultados obtenidos por PSIBLAST.

-SSPRO (Baldi et al., 1999)

Método que utiliza una red neuronal recurrente bidireccional de ventanas fijas combinado con un alineamiento múltiple generado automáticamente a partir de los resultados obtenidos por una búsqueda con PSIBLAST.

En una predicción de estructura secundaria, por cualquiera de los métodos expuestos anteriormente, cada uno de los aminoácidos va a ser clasificado en tres posibles estados: α hélice, hoja- β u otro. En todos ellos, es asignado un índice de fiabilidad, con valores que oscilan entre 0 y 9, y que influye en la exactitud de la predicción.

Existe un sistema para la evaluación automática de servidores de predicción de estructura secundaria denominado EVA (Koh et al., 2003), que evalúa semanalmente cada uno de los métodos empleados; para ello se emplea una puntuación que describe la precisión de cada método.

- **Estudio de la estructura terciaria de las proteínas de EfV1**

Dentro de la gran variedad de las proteínas se reconocen algunos patrones estructurales comunes, y la presencia de estos patrones permite predecir una estructura para cualquier proteína. Los tres caminos que se siguen para predecir la estructura terciaria de una proteína son: modelado por homología, plegamiento inverso (threading) y métodos *ab initio*. A partir de la estructura primaria de una proteína, se buscan secuencias similares en las diferentes bases de datos primarias y se realiza un alineamiento múltiple para reconocer las regiones más conservadas, en donde no debe haber inserciones y lo más probable es que estén relacionadas con la formación de un tipo de estructura secundaria. Si se encuentra una o varias proteínas homólogas en el banco de datos de proteínas cristalizadas (PDB), entonces se lleva a cabo el modelado por homología. Sin embargo, si no se encuentran homólogos en el PDB, se realiza el plegamiento inverso, que consiste en encontrar una estructura o plegamiento compatible, de acuerdo con ciertos criterios. Si se descubre un plegamiento que esté relacionado con la secuencia, entonces se puede regresar al modelado por homología utilizando

la estructura cristalográfica de este homólogo distante que es una proteína que diverge tanto de la secuencia problema que no llega a detectarse homología a nivel de secuencia pero que sin embargo conserva la estructura. Sin embargo, si no se encuentra un homólogo lejano, si el plegamiento inverso no dio resultados, entonces se predice la estructura terciaria *ab initio*. En éste último caso los programas empleados en el estudio de estructura terciaria tratan de encontrar proteínas de estructura similar a la que adoptaría una secuencia dada cuando la homología entre la secuencia y la estructura está por debajo del límite para el modelado por homología.

Existe una gran variedad de programas de plegamiento de proteínas, de esta forma el empleo de varios métodos en la predicción de una estructura permite hacer una predicción más fiable. Estos programas realizan una predicción de la estructura terciaria de proteína a partir de su secuencia. Hace unos años, realizar esta tarea de modo fiable y rápido era algo impensable, pero con el avance en el desarrollo de algoritmos comparativos y con el contenido cada vez mayor de las bases de datos estructurales, actualmente es posible llevar a cabo predicciones orientativas. Los métodos empleados en éste caso son:

- **ESyPred:** El método realiza diversas estrategias de alineamiento empleando redes neuronales. Las alineaciones se obtienen mediante la combinación, la ponderación y clasificación de los resultados de varios programas de alineación múltiple. La estructura tridimensional final se construye con el programa de modelado Modeller.

- **CHPmodels:** El algoritmo se basa en homologías con proteínas ya existentes, comparando la secuencia problema con las ya existentes en las bases de datos, para asignar una estructura tridimensional posible. El gran problema que presenta

es que no es capaz de general modelos estructurales de secuencias totalmente nuevas y sin alta homología con las ya existentes, aunque sean secuencias de aminoácidos cortas.

- **Modeller:** se utiliza para realizar modelado molecular. Modeller incluye varios módulos que llevan a cabo diferentes acciones, desde alinear las secuencias homólogas y determinar los residuos conservados, hasta construir el modelo con base en definiciones de las restricciones espaciales y geométricas que se obtienen del alineamiento de la estructura con la secuencia problema y restricciones estereoquímicas.

- **M-Fold:** el programa busca la mejor conformación teniendo en cuenta como queda la región desapareada si realizamos cada emparejamiento. El programa va modificando las regiones apareadas hasta encontrar una solución subóptima al problema.

Análisis filogenético

Para investigar las afinidades evolutivas de la secuencia de EfV1 se realizó un análisis filogenético basado en alineamientos múltiples de secuencias de EfV1 (tanto del genoma completo como de cada una de las proteínas que codifica) con secuencias de genes y proteínas similares pertenecientes a otros miembros de la familia *Totiviridae*.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de EfV1 con las de otros virus fue realizado con el programa CLUSTAL-X. Las distancias entre pares de secuencias fueron estimadas con el programa Mega 3.0 utilizando el método basado en el modelo de dos parámetros de Kimura (Kumar et al., 2004). La

fiabilidad de las ramas de los dendrogramas se valoró por el método de bootstrapping (Saitou y Nei, 1987).

III. Resultados y discusión

Clonación

Dos experimentos independientes de síntesis de cDNA con oligonucleótidos al azar dieron como resultado una colección de clones de tamaños comprendidos entre 200 y 500 nt. Los clones de cDNA fueron ensamblados generando cuatro contigs independientes, cuyo tamaño suponía aproximadamente 4.5Kb (Figura 16). Una de las zonas no clonadas entre dos contigs estaba aproximadamente a 600-800nt del posible extremo 5' del genoma y las otras dos zonas no clonadas cerca de la zona de unión de los dos posibles genes que conforman el genoma de EfV1. El hecho de que no se obtuviesen clones de estas tres zonas intermedias del genoma podría deberse a la existencia de estructuras secundarias en el RNA que interfieren en el proceso de síntesis de cDNA.

Figura 16. A Representación gráfica de la situación de los cuatro contigs de cDNA obtenidos y las 3 zonas intermedias no clonadas. La posición de los contigs se muestra con referencia a un hipotético genoma completo de aproximadamente 5.2 kbp, tamaño del dsRNA de EfV1 estimado por electroforesis en agarosa. B. Representación de los primers diseñados y su posición en la longitud total del genoma.

Clones de cDNA de las zonas no clonadas entre contigs se obtuvieron con oligonucleótidos específicos de las secuencias que las flanquean (Tabla 13). En el caso de los extremos 5' y 3', se utilizó la técnica RACE (Frohman et al., 1988), para la cual se diseñaron oligonucleótidos complementarios a los extremos de los contigs 1 y 4 (Tabla 13). Se obtuvieron cuatro clones con idéntica secuencia de la región UTR5' y del extremo UTR 3' fueron obtenidos tres clones de cDNA con la misma longitud y secuencia.

El número de clones empleados en la secuenciación del genoma completo de EfV1 fueron un total de 176, en su mayoría procedentes de los experimentos de síntesis de cDNA con oligonucleótidos al azar. Con una selección de los clones más grandes y representativos de toda la longitud del genoma, se puede llegar a obtener la secuencia final de EfV1, como se muestra en la figura 17.

Figura 17. Representación del genoma completo de EfV1 obtenido a partir del ensamblaje de una selección de clones de cDNA, de entre un total de 176.

Organización del genoma de EfV1

El genoma completo de EfV1 tiene una longitud total de 5109 nucleótidos (Figura 18). La secuencia del genoma completo fue depositada en la base de datos EMBL/Genbank con el número de referencia AM261427.

Figura 18. Secuencia completa del genoma de EfV1. La secuencia deducida de aminoácidos de los dos ORFs se muestra debajo de la secuencia. El ORF1 está indicado en morado y el ORF2 en azul, ambos se solapan en el tetranucleótido AUGA en posición 2568-2571. En este tetranucleótido están los codones para el inicio de ORF2 y el final de ORF1. Los ocho motivos conservados característicos de RdRp de virus de RNA_{bc} que infectan eucariotas simples están enmarcados en gris. En morado se enmarcan los codones de inicio y parada de ambos ORFs.

```

UGAUAGACAAGGUCUGUACCCCAACGUUCCCUGUCUGUCUCUCCCCCGGGCGGCUUC
GGCCGGCGCACUAGGCGCAAGACCUAGCAGUGCUGUCUGUGCGGUUAUCACGCAGACGAG
UUGGAUGCUCUGGCAGGGUCAAUCCCCUGCCGUGAGCCGUGGUGUGCCUGAAGAAGCCC
AUGCCACGGGGCGCACAUAAUUGUAUCUGUUUGGAGGAGGGUCCUAAGAUCCTAAAC
UUUACGAUAUCCCAACUGCACAGAAAACCAUGAUGAGCACCGCUCAAACCCAGAACUUC
M M S T A Q T Q N F
CAGGUCCGCCACCUGGCCCCCUUACCGGCGCGGUCGACACCCCGUCGGUGGCCUCCUC
Q V R H L A P L T G A V A D P V G G L L
CAGCGCGGGAAGGACUCCGCGUUAUCGAUCCGGGCUUCUUCAGAGAUCCUGGUCCC
Q R G K D F R R Y R S G L S S E I P G P
GGGCGCACCUUCGUGGAGUACCGCUCGAUCUUCUACGAGGUCGGGCGCAUACGGCAAC
G R T F V E Y R S I F Y E V G R H Y G N
AUCUCUGAUGCGCUCGCGACGCCACGCCGGCGGCGUGCCGCAUUGAUUGUAGUCACACA
I S D A L A T P T P A A V R I D C S H T
AUCAACGAAACGCAGGCCGUAACUUCGAGGGCUUGGUCGCCAGUACUCGAACUUUGCC
I N E T Q A A N F E G L A R Q Y S N F A
UCCCAGUGGGAGAAAUGGACCUUUGUGGUAUUGCCGAGCGCCUGGCUCGCGUAUUGCC
S Q W E K M D L C G I A E R L A R A I A
ACUCAGAGCGUCUUCGGGGGCGUAACCACCACGCACAUGCGUGCGGGCCAGCCCCUCCGA
T Q S V F G G V T T T H M R A G Q P L R
GUCGUAGCCUCGGUACGCUCGACUCGCCACAGACAGCGAGCACAUUGUCCGUGUUAUC
V V A L G T L D S P Q T A S T S S V F I
CCUCGUACUGUUGACAGUGUGGGGAGUGACCACGUAUUCGCCGUUUUGUGGCCGUGCA
P R T V D S V G S D H V F A V L C A A A
AACGGGGAGGGCGGUCUGUUUCUACCGACGUGCUGCGUCUAGAUGUGAGCAUAACGCU
N G E G A S V S T D V L R L D V S N N A
CCUCUCGUCCCCGCCGUGGCGGCGCCCCCUAGCUACGGCAUGUGUCGAAGCCUCCGU
P L V P A V A G A P L A T A C V E A L R
GUUCUUGGCGCUAACAUAGGAGAGCGGGGCGGCGAUCUCUUCGCCUAGCUGUCACC
V L G A N M E E S G A G D L F A Y A V T
CGUGGUAUCCACCGCGUUGUAACAGUUGUAGCCACACGGAUGAGGGUGGCAUCCUUCGU
R G I H R V V T V V S H T D E G G I L R
GACUUAUCCGUCACGAUGCAUUCGCGUCCCCUACGGUGGUAUUAUGCAUCCUUGAGG
D L L R H D A F R V P Y G G I N A S L R
CACUACCCCGCCCCUCCCCAGUGCAGCGGGCUCUACUGAGUCCUCUACGCGAGCGUGGGUY
H Y P A L P S A A G S H E S S I A A W V
GAUGGUAUCGCCCUCAAGACUGCCGCCGUCGUCGUCACUGCGACCCCCUCGUCCCCGGA
D G I A L K T A A V A A H C D P L V P G
GUCGGUGGUAUGUACCCACUGUCCUCGUGGCGUCGAAAGGUGCGAUUCCCCGCCUGGA
V G G M Y P T V L V A S K G S I S P P G

```

ACUCCGAGGGCGAUGUCUGCCCCGACGACGCUCGGUCCCUCGGUCGCCAGCUUUCUGCC
 T P E G D V S P D D A R S L G R Q L S A
 GAUAUCGGUCGUUUCGCCCCAACUAUAUCCGGGGACUCAGCGCUCUUUCGGCCUACAA
 D I G R F A P N Y I R G L S A L F G L Q
 GGCUACACCGCAAUAGCCGAACGGCACCUGUGUGCCACGGCUGGGCACUACCUAGAGGAG
 G Y T A I A E R H L C A T A G H Y L E E
 AAUUCGGCGACAAACCGGCAUCUCCUCAUAAGACCAUCGCUCCAUAUCUUGGGUGGAG
 N S A T N R H L L H K T I A P Y F W V E
 CCGACCUCCUCAUCCCCGAGAUUCCUAGGUACUUCUGCAGAGAGCGAGAACUACGCU
 P T S L I P R D F L G T S A E S E N Y A
 GCAAAGGUGUCACCGGGGUGUGUAGCUCACGAGCCCCUUUCGAGAAGUUCGCUCCACUC
 A K V S P G C V A H E P L F E K F A P L
 GCACAGGGGACAACUAUGACCUGUGCGACAGCGGGUUUCAAGAUGAGGACUGCGCGGACG
 A Q G T T M T C A T A G F K M R T A R T
 UCCGGGUAUGUGUGCACAAAGCCGUGCCCCUGCAUCCUGGCGAUGAUCCAGCUGAAG
 S G Y V C S Q A A A P A S L A M I Q L K
 CAGUUCGACACACAGUCGGUUGUCUAGCUGGCGACCAAGGGCCAAUAUCGGGGGACGUC
 Q F D T Q S V V L A G D Q G P I S G D V
 GUCACCAAGCACCGCGCAUCUAGCCCGUGUCCUCCUAUUUGUGGGUCCGGGGCCAGAGC
 V T K H R A S S P L S S Y L W V R G Q S
 GCUCUGCCGGCCCCCGCAGAGUUUAUCAUACCCAGGGCUGCUACGGCGCAAAAUCAAA
 A L P A P A E F I N T Q G C Y G A K I K
 CUCGUCGAUUGGACGGAUGAUUGGGACCCCGAAUCGACCGACGUCCCGCGGCCUGAUCAG
 L V D W T D D W D P E S T D V P R P D Q
 UUUGCCACCGGUGUUGUUGCUUGGCGUGUGUCUCUACCAACCGGGCUACCGACGGGCCCC
 F A T G V V A W R V S L P T G L P T G P
 AGCAAUGCUGCCGAUCGGCAAGCUCGACGCGCCAGGUCACGCGGCGCCAUCGCCUUAGCU
 S N A A D R Q A R R A R S R G A I A L A
 CAGGCGUUAACAGAGCAAGAGCGUUCGGGAAGGAGCGUCGCCUACCAUGGAAGUAAGC
 Q A L N R A R A F G E G A S P T M E V S
 GAUGUCCUCCCGAUUUGGGUCUGGCGGACUAGGUCAUACGACCAUACGGGGUUCGCU
 D V P P D L G L A D L G H Y D H T G F R
 GAACACCGUUCGACCCCGGAAAGCGCAGGAGACAGGGGACGGCAACCCCUACCAACC
 E H R S D P G K A Q E T G D G N P S P T
 CCUACACUCCUGCGCGGUGCUGCUAUGCCACCAACUGAGCAGCACAAGCCUCAGGGUGGA
 P T L L R G A A M P P T E Q H K P Q G G
 CCGCGGCUCCCGGCACCCCAACCAUGGGGGCGCGCCGCCGACCCGUCGACCCCCA
 P R L P A P P P T M G R A A G P V G P P
 UCCACGCCAGCCCCUCCCCCCCCCGCCCCAGUUAUCGCCCCUCCGACUGUCAGUGAUCCU
 S T P A P P P P A P V I A P P T V S D P
 CCUCCCAUGCCUGAGGCUGCCACCGGUGCCGAACCGGUGCCCCAAGCAUGAUUGAGUCCA
 P P M P E A A T G A E P V P Q A *
 M I E S
 CAGUGGCCGACCGCGCCAACGCAGCGGGCUCGGUGGGCCGAUACCUGGAAGCGCUGCUCC
 T V A D R A N A A G S V G R Y L E A L L
 CCUCGGAAUAUACACGUGUCGUGUCGACACUCCAUCGACCACCAAGUUUCCUUUGUUU
 P S E Y T R V V S T L P F D H Q V S F V
 ACAGGCCGUCGUGGAGGCAUCAUAAACCCACCGAACUUCAGCGCGUGGCCGCGUGCCUCC
 Y R P S W R H H K P T E L Q R V A A A F
 UACUUCCCGGUGUACCCGUGCAGGUGUCAUACAGCGCGGGCUCUAUACUUACUCUCCUCA
 N L P R V P V Q V S Y S A G S I L T L L
 ACGCCACCUUGCCUAACCUCUCCCCUAGGCAUACUUAACACGCCGGGUGGUGUGUGAUA
 N A T L P N L P P R H T Y H A G W S C D
 GCGACGCGACCCGCAAAGCCUCCCCUGAAGGCUAACCCCGCCGCAUCCAACAAAGUCA

S D A T R K A F P L K A N P A A S N K V
 AUGUUUAUCUCUCUGAGGUAUGCUACGACUUGCGCCGACCAUCCUGGUGAAGCUAUGG
 N V Y L S E V C Y D L R R T N P G E A M
 CGGCCGAGGCAGCACUUCAGCGGGUCCGUUCCUCAGGUAGCGUAUACAACGACCAGGCUA
 A A E A A L Q R V R S S G S V Y N D Q A
 CAGCUGUCGUUUUGUACGGCUUCUGCUUAGCUCGCAACGGCCUGCCGGGGGCCUAUGAUA
 T A V V L Y G F C L A R N G L P G A Y D
 UCGCGCUCGCCUUGUACUGAACCCCGACUACGCCAAGUCACUCACCGGCGUCCUCAAGG
 I A L A L L L N P D Y A K S L T G V L K
 CAACGGGCGGCAAUGCAACGGCUGUGGGUUCACUCCUCGUGGAGGCCAACACACUCCUCG
 A T G G N A T A V G S L L V E A N T L L
 GGCGAGACGUCGCCCCUGUCGACCUCGGCAAGGAGUUAACAUGCGCACACAGCUCCGCC
 G R D V A P V D L G K E F N M R T Q L R
 UAGCAGAGAGAACAUGGCCGAGUAUCCCCGACGUUCUUCGGGCUACAGUCAGGCGCG
 L A R E N M A E Y P P D V L R A T V R R
 UCCUCCUUGACGAGCUGACACGGCGCGCAGGGUCAUAUGAAUAGACUACCCUUCGUUGG
 V L L D E L T R R A G S Y E L D Y P S L
 AGGAGCAUUGGGAUCCCCGUGGGCAUGGGCUGUUAUGGCGCCAGGGAGGAGCGAUA
 E E H W D S R W A W A V N G A Q G G A I
 CCGACAAGGGGCUCAAUCCGCUCCCCGUGCCCGGUGCAACUCGGGAUAUCGCCGCU
 T D K G L E S A P R P P G A T R E Y R R
 CGUGGCUCGAACGAGUGGAGGAGGACCCUCGCCCCAGUGGGACGGCACAACCGAAGUGU
 S W L E R V E E D P R P Q W D G T T E V
 CUGCCUCAUCCAAACUCGAGCACGGUAAAACACGCGCAUCUUCGCGUGUGACACCGUUA
 S A S S K L E H G K T R A I F A C D T V
 ACUACCUUGCUUUCGAGCACCUCUAGUCCACCGUCGAGGCCAACUGGCGCGGCGUCCGGG
 N Y L A F E H L M S T V E A N W R G V R
 UAGUUCUCAACCCCGGGAAGGGCGGUAACAUGGGGAUGGCGAUGCGUGUGCAAGCUGCUC
 V V L N P G K G G N M G M A M R V Q A A
 GGAGGCGAUGCGGUGUCUCGCGUGAUGCUCGACUACGAUGACUUAUUCGCACCACACCA
 R R R C G V S L M L D Y D D F N S H H T
 UAAGUGCGAUGCAAUUCGUUGUCGAAGAGGUUUGUUCUAUUAACCGGAUAUGACCCUGACC
 I S A M Q I V V E E V C S I T G Y D P D
 UCGCGGCCCGGCGUGGUUGCCUCCUCGACAAGCAGUACAUCACACUCGCGGGACGGCGGA
 L A A R L V A S L D K Q Y I T L A G R R
 AACUUUCUGUCGGUACCCUUAUGAGUGGGCAUCGAUGUACAACCUUUUUAACUCCGUCC
 K L S V G T L M S G H R C T T F F N S V
 UCAAUGCCGUUUACGUACGGCUUGAAUUGGGCGAACCGUUCUACUCGGAGACAGUGAGCC
 L N A V Y V R L E L G E P F Y S E T V S
 UGCACGUCGGUGACGACGUGUACAUGGGCGUUCGUGAUUACGUUUCGGCAGCGUACGUCA
 L H V G D D V Y M G V R D Y V S A A Y V
 UCCAACGCCUAGCGGACAGCCCCUGAGAAUGAACGCUCUUAAGCAAUCCGUCGGGCACG
 I Q R L A D S P L R M N A L K Q S V G H
 UGUCGACGGAGUUCUACGUUACGCGACCGGCGCUAGGGAUUGUACGGAUAUCUCAC
 V S T E F L R I A T G A R D C Y G Y L S
 GCGCGGUCGCAUCAAUUGUAGCGGGAACUGGGUGAAUGACACCGCCUCGCUCCCUUCG
 R A V A S I V S G N W V N D T A L A P F
 AAGGGCUAGCGGCUAUGGUCGCUUCCGCCCGAUCCUCGCCAAUCGAGGGGAAGACAAACU
 E G L A A M V A S A R S L A N R G K T N
 UGGCGCCUCUACUGUUGGUGUCCAGCGUGCUACGAAUAGCCAAGCUGGGCAAGCGACACU
 L A P L L L V S S V L R I A K L G K R H
 ACGGCAAGGUCUCUACUACUCGAUGGCACCGUCGCCCUCGGCAACGGACCACAAUACU
 Y G K V S S L L D G T V A L G N G P Q Y
 CCUGCGGCGCCCAUAUGCGCUGGUGUAACCCUGUGGUCGUACGGAUACUCCGACCCCU

```

S C G A H M R W C N P V V V R D T P D P
GGGGUUUAUCUGAACUACCUCUGGAGUCGGUUACGGCAUACCUCUCGCGGGCUGCAUCGC
W G Y T E L P L E S V T A Y L S R A A S
CUUUAGAGUGGGAGGUCCUCGGUGAGGCUGGCAUAUCUGUCACGGAACAAAUGGCUGCGG
P L E W E V L G E A G I S V T E Q M A A
CUAGUUUAUCGUAAAACUUACGCAAGUCUGUUCUGGCGCGGAGAGCGUCUCACCCUGGGCC
A S Y R K T Y A S L F W R G E R L T L G
CAACCCUAUCUAAAAGCGCCGAUCGGCUCAGCGAGUGCGGAAGACUUGGCCCCUGCAACCA
P T L S K A P I G S A S A E D L A R A T
AACCACACGGUCUUCUCGCACAAUACCCUCUUUUGCUGCUGGCGCGUGACCGCAUACCGG
K P H G L L A Q Y P L L L L A R D R I P
AGACACUCGUACGCGUCGCGCUCGGAAGCUGGCGGCAACCCACACACAUCGCACCUAG
E T L V R V A L G K A G G N P H T S H L
CGUAUGAUGCGUGGGGAGAGUAUGAUCACGGCUGCCAGAUCCAAACGGUCUUAGGAUACG
A Y D A W G E Y D H G C Q I Q T V L G Y
CAGAUGCCCGUGCCUUCGGAAGCGGACGAGUGCUGAUGUACUCACAUCGCGGACACUAA
A D A A A F G K R T S A D V L T S R T L
UGUACGUUUGAUUCCACACGACGUCAAUCGUCGUGCAUUUAUAUCCGGGGCCAUGGCC
M Y V *
CAGAAAGCA

```

En la secuencia completa de EfV1 se detectaron dos marcos de lectura abierta diferentes (Figuras 18 y 19); por un lado el ORF1 tiene una longitud de 2301 nucleótidos, su comienzo se inicia con dos codones AUG consecutivos y codifica una hipotética proteína de 765 aminoácidos. El ORF2 es algo mayor y tiene 2484 nucleótidos que codifican una hipotética proteína de 826 aminoácidos. Ambos ORFs se encuentran solapados por una zona de cuatro nucleótidos AUGA, que se corresponde simultáneamente con el codón de parada del ORF1 (UGA) y el codón de inicio de ORF2 (AUG). Esto supone que ORF2 tiene un desfase de lectura de -1 con respecto al ORF1. Búsquedas de otros posibles ORFs en ambas cadenas solo identificaron algunos ORFs con longitudes menores a 460 nucleótidos

Las regiones no codificantes (UTR) situadas en los extremos cuentan con 270 nucleótidos en el caso de la región UTR 5' y de 58 nucleótidos en el de la región UTR3'. Aunque se obtuvieron varios clones idénticos de cada UTR en experimentos independientes, la longitud de ambos extremos no fue confirmada

por medio de experimentos de "primer extensión", por lo que su longitud final podría ser mayor de la obtenida mediante RACE.

Figura 19. Organización del genoma de *Epichloe festucae* virus 1 (EfV1), la secuencia de ORF 1 es similar a otras que codifican proteínas de cápsida de totivirus, y la secuencia de ORF 2 es similar a la de varias RdRp de micovirus. En ORF2 se muestra la posición de los ocho motivos conservados dentro de la familia *Totiviridae*.

La característica organización genómica que se presenta en miembros de la familia *Totiviridae* contiene dos ORFs en su genoma, el ORF 5' proximal codifica una CP y el ORF 3' codifica una RNA polimerasa-RNA dependiente (RDRP). En el caso de EfV1 podemos comprobar que la organización de su genoma concuerda con la de esta familia.

Análisis de los ORFs del genoma de EfV1

1. ORF1

- **Características del gen**

ORF1 tiene una secuencia de 2301 nucleótidos cuyas características se detallan en la Tabla 14. La presencia de gran cantidad de C+G a nivel de la secuencia nucleotídica, permite codificar proteínas que presentan un número mayor de aminoácidos que aportan estabilidad térmica como son arginina, alanina y glicina y menos de los que la reducen como serina y lisina.

Tabla 14. Características de la secuencia de nucleótidos del ORF1 de EfV1.

Nº de bases traducidas		2298
Adenosina (A)	17.89%	411
Guanina (G)	28.02%	644
Timina (T)	19.76%	454
Citosina (C)	34.29%	788
A+T	37.64%	865
C+G	62.32%	1432

- **Estructura primaria de la posible proteína codificada por el ORF1**

La traducción de ORF1 da lugar a una proteína de 765 aminoácidos, algunas de sus características están indicadas en la Tabla 15. El estudio de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por ORF1 permite detectar uniones peptídicas que varían su flexibilidad en función del tipo de aminoácido que esté implicado y de las restricciones estéricas impuestas por cada uno de ellos que harán que la proteína adquiera una estructura más compleja.

Tabla 15. Características deducidas de la secuencia de aminoácidos de la posible proteína codificada por ORF1. Por tanto, con esta secuencia primaria de aminoácidos se generaron representaciones de, por ejemplo, como varía la hidrofobicidad a lo largo de la secuencia de la proteína para tener información que ayudará a conocer la disposición de determinados residuos en la predicción (Ver apéndice II).

Peso molecular	80170.52 Daltons
Número de aminoácidos	765
Aminoácidos básicos (+) (K,R)	62
Aminoácidos ácidos (-) (D,E)	69
Aminoácidos hidrofóbicos (A,I,L,F,W,V)	273
Aminoácidos polares (N,C,Q,S,T,Y)	185
Punto isoeléctrico	6.608
Carga a pH 7.0	-3.831

- **Función y homología de la posible proteína codificada por el ORF1**

En las búsquedas realizadas con el algoritmo FASTA en las bases de datos públicas se encontraron varias proteínas que presentan una homología substancial con el producto de ORF1. Únicamente se han considerado proteínas cuya identidad con respecto a las secuencias de EfV1 fuera mayor del 30%.

Las proteínas más similares al producto de ORF1 son un conjunto de proteínas de cápsida de totivirus que infectan a hongos filamentosos (Tabla 16). Por lo tanto, es muy probable que el ORF1 codifique la proteína de la cápsida. En el caso de los micovirus con genomas de RNAbc, la mayoría presentan una cápsida icosaédrica e isométrica de forma que las subunidades proteicas se van a unir en los vértices o en las caras de un cuerpo con simetría cúbica.

Durante la última década, un número significativo de estudios han establecido que la organización T=2 es una característica común en la cápsida de virus de RNAbc (Lawton et al., 2006), sin embargo la estructura de la cápsida de HvV190S, un miembro de la familia *Totiviridae*, ha sido resuelta y está formada por 60 dímeros con una organización T=1 (Ghabrial et al., 2002). Actualmente no hay muchas proteínas de cápsida de virus de dsRNA cuya estructura tridimensional haya sido resuelta a nivel atómico, pero destacaremos 4: los núcleos de UP3 de orbivirus Bluetongue (Grimes, 1998), λ 1 del reovirus en el género de orthoreovirus, y Gag de L-A virus y HvV190S ((Naitow, 2002; Castón et al 2006).

Tabla 16. Secuencias de proteínas con mayor similitud al producto de la traducción del ORF1 de EfV1.

DB: ID	Organismo	Función	Longitud	Identidad %	Similitud %	Solapamiento	E ₀
Q99AT4	Gremmeniella abietina RNA virus L1	Posible proteína de cápsida	776	55.871	78.065	775	2E-117
Q9YXE5	Sphaeropsis sapinea RNA virus 2	Proteína de cápsida	789	57.011	78.704	756	2.2e-117
Q6GYC1	Gremmeniella abietina RNA virus	Posible proteína de cápsida	776	56.443	77.835	776	8.3e-117
Q8AZ67	Coniothyrium minitans	Posible proteína de cápsida	775	55.352	76.371	766	4.5e-114
Q9YXE7	Sphaeropsis sapinea RNA virus 1	Proteína de cápsida	833	35.324	60.991	787	1e-53
O57O43	Helminthosporium victoriae virus	Proteína de cápsida	772	37.620	62.107	731	1.6e-52
Q76L28	Helicobasidium mompa n° 17	Proteína de cápsida	788	34.620	61.776	777	2.1e-48
Q6Q425	Thielaviopsis basicola RNAbc virus 1	Proteína de cápsida	770	34.483	59.151	754	7.2e-44
Q60GI3	Eimeria brunetti RNA virus 1	Posible proteína de cápsida	746	33.508	60.079	764	3.6e-43
Q98XW9	Magnaporthe grisea virus 1	Proteína de cápsida	770	26.810	53.775	649	1.1e-14

- **Dominios conservados en el producto de ORF1**

El alineamiento múltiple de las secuencias de la cápsida de todos los miembros de la familia *Totiviridae* se realizó para buscar motivos conservados. Como resultado se localizaron algunos motivos que parecen estar conservados en totivirus que infectan a hongos filamentosos, es decir en los miembros del género *Victorivirus* (Ghabrial y Nibert, 2009).

Hay al menos tres dominios conservados, que se localizan en posiciones distantes entre sí (Tablas 17 y 18). Esto supone todo un referente nuevo ya que la existencia de dominios conservados dentro de la cápsida de totivirus no ha sido aún determinada. Esto podría indicar la importancia de estas regiones en una conformación estructural de la cápsida que es específica para virus que han de sobrevivir en hongos.

Tabla 17. Representación de tres motivos conservados dentro de la proteína de la cápsida, donde X es cualquier aminoácido y entre paréntesis se muestran dos aminoácidos que pueden variar en una posición. Estos motivos son encontrados solo en miembros de la familia *Totiviridae* que infectan hongos filamentosos.

Posición	Motivo
Aprox. en 340	(S/A)VFIPR(T / L)V
Aprox. En 425	EALRXXG(A / S)NV
Aprox. En 780	YLWXRQGS

Tabla 18. Secuencias correspondientes a los tres motivos conservados de la proteína de la cápsida en algunos miembros del género *Victorivirus*.

Especie	Motivo I	Motivo II	Motivo III
<i>Coniothyrium minitans</i> virus	SVIFPRTVD	EALRIVGANV	YLVVRGQS
<i>Gremmeniella abietina</i> RNA virus L2	SVIFPRTVD	EALRILGANV	YLVKRGQS
<i>Sphaeropsis sapinea</i> RNA virus 2	SVIFPRTVD	EALRIWGANV	YLVVRGQS
<i>Epichloë festucae</i> virus 1	SVIFPRTVD	EALRVLGANV	YLVVRGQS
<i>Sphaeropsis sapinea</i> RNA virus 1	SVIFPRLVD	EALRILGANV	YLVVRGQS
<i>Helminthosporium victoriae</i> 190S virus	AVIFPRLVN	EALRLLGSNV	YLVVRGQS
<i>Thielavidopsis basicola</i> RNA virus 1	SVIFPRLVN	EALRIVGANV	YLVDRGQS

- **Estructura secundaria del ORF1 de EfV1**

Para la predicción de las estructuras secundarias y de su accesibilidad al disolvente, se utilizaron distintos programas y los resultados han sido comparados teniendo en cuenta fundamentalmente la información aportada por PROF (Figura 19). El resultado de esta red neural de predicción consiste en la asignación a lo largo de la secuencia de la probabilidad de que cada aminoácido de la secuencia pertenezca a una estructura tipo α -hélice (H), hoja β (E) u cualquier otra conformación (L/C), considerando para la asignación de cada residuo una ventana de 21 aminoácidos. El valor de la probabilidad viene establecido con un valor que varia de 0 a 9 y que es el grado de fiabilidad, siendo más fiable cuanto más próximo esté a 9. En las figuras se han indicado en negrita aquellas predicciones que presentan una fiabilidad mayor de 7.

	MSTAQTQNFQVRHLAPLTGAVADPVGGLLQRGKDFRRYRSGLSSEIPGPGRTFVEYRSIF
SSPRO	CCCCCCCCCCCCCCCCCHEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEE
PSIPRED	CCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHCCCCCCHHHCCCCCHHHHHHCCCEEECCCCCCCCCCCCCEEEEE
JPRED	-----EEE-----EEEEEEEEEE-----EEEE
PROF	LLLL..L.....LLL.....E..LLL.....EEE
	eee e eeb e bbebbbbbb bee ebeeebeb bbbbb b b eeee e bbb
	10 20 30 40 50 60
	YEVRYHGNISDALATPTPAAVRIDCSHTINETQAANFEGLARQYSNFASQWEKMDLGGIA
SSPRO	HHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEECCHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHCHHHHH
PSIPRED	EEEEEECCCHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHH
JPRED	EEEE-----HHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHH
PROF	EEE.....LLLL.....LLHHHHHHHHHH.....HHHH
	bbbb e ebbb eeebb bbbb bebb be b ebb bb bbb b eb bbbbb
	70 80 90 100 110 120
	ERLARAIATQSVFGGVTTHMRAGQPLRVVALCTLDSPQTASTSSVFIPRTVDSVGS
SSPRO	HHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHCCCCCEEEEEEECCCCCCCCCCCCCHHECCCHHHHCCCCHHH
PSIPRED	HHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHCCCCCEEEEEEECCCCCHHHCCCCCECCCHHHHHCCCCCHH
JPRED	HHHHHHHHHHHHEE-----EE-----EEEEEE-----EEE-----H
PROF	HHHHHH.....LL.....EEEE.....LL.....EE.....LLL.HH
	bb bbbbbbbbbbbbbb bbb ee bb bbbbbb eb b bbbbbbbbbb b ebb
	130 140 150 160 170 180
	FAVLCAAANGEGASVSTDVLRDLVSNNAPLVPVAVGAPLATACVEALRVLGANMEESGAG
SSPRO	HHHHHHHHHCCCCEEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCC
PSIPRED	HHHHHHHHHCCCCEEECCEEEECCECCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCC
JPRED	HHHHHHHHHH-----EEEEEEEEEE-----E-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----

PROF **HHHHHHHH**.L**LLL**.**E**...**EEEE**.L**LLL**L.....LL....**HHHHHHHHHH**.....L
 bbbbbbbbbbb bbbbbbbbbbb b b ee bbbbbbb bb bbbbbbbbbbbbbbb bbbbbbb
 190 200 210 220 230 240
 DLFAYAVTR**C**IHRVVTVVSHTDE**GC**ILRDLLRHDAFRVPY**GC**INASLRHYPALPSA**C**SH
 SSPRO HHHHHHHHHHHHHHCEEEEECCCCCHHHHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHHCCCCCCCCCCCCCH
 PSIPRED HHHHHHHHHHHHHHHHEEEEECCCCCHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
 JPRED -HHHHHHHHH--EEEEEEEE--H--HHHHHHHHHH-----
 PROFL**L**..**EEEE**...L....**HHHH**.....LL.....L**LLL**L..LL..
 bbbbbbbbbbbbbb bbbbbbbbbb eb bbbbbbb be bbbb bee e
 250 260 270 280 290 300
 ESSIAAWVD**G**IALKTAAVA**AH**CDPLVP**GVGG**MYPTVLVASK**GS**ISPP**GTPE****G**DVSPDDAR
 SSPRO HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHH
 PSIPRED CCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCECCCCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCHHH
 JPRED -HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEEEEEE-----HHH
 PROF **.HHHH**.**HHHHHHH**.....L....LL....**EEE**.L**LL**..**LLLLLL**L**LLL**..**HHH**
 bbbbbbbbbbbbbb bbbbbbbbbb e ebbbbb eee e e eeee e e b b
 310 320 330 340 350 360
 SL**R**QLSAD**I**GRFAPNY**I**R**GL**SALF**SLQ**GYTAIAERHLCATA**CH**YLEENSATNRHLLHKT
 SSPRO HHHHHHHHCCCHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCC
 PSIPRED HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEECCCCCHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCC
 JPRED HHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHH-----
 PROF **HHHHHHHH**H..**HHHHHHHHHH**...L**LL**..**HHHHHHHH**.....L**LLL**L.....L**L**
 b bbe beebbe bb bbbbbbbb e bbb bbbbbbb beeeee bb bbbbb
 370 380 390 400 410 420
 IAPYFWVEPTSLIPRDFL**G**TSASEN**Y**AAKVSP**GC**V**A**HEPLFEKFAPLAQ**GT**MTTCATAG**G**
 SSPRO CCEEEEECCCCCCCCCHHCCCCCHHCCCCCHCCCCCHHHHHHHHHHHHCECCCCCEEEEEEE
 PSIPRED CCEEEEECCCCCCCCCCCCCHHHHCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHEECCCCCEEEEEEE
 JPRED ---EEEE-----HHH-----HHHHHHHHHH-----EEEEEE
 PROF**E**...L**L**.....L....L**LLL**L.....**HHHHH**...L**LLL**.....**E**
 bbbbbbbbbbbbbb b bbbbe ee b ebbe bee eee eb bbbbbbb
 430 440 450 460 470 480
 FKMRTARTS**G**YVCSQAAAPASLAMIQLKQFDTQSVVLA**G**DQ**G**PIS**G**DVVTKHRASSPLSS
 SSPRO EECCCCCCCCCHHHHHHCCCHHHHHHHHHHCCCCCECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
 PSIPRED EECCCCCCCCCHHHHHHCCCCCCCCCECCCCCHHCCCCCCCCCCCCCHHHCCCCCCCCCHHH
 JPRED EEE-----HHHHHHH-----HHHHH-----EE-----H
 PROF **E**.....**HHH**...L**LLL**L.....L**LL**.....L**LLLLLL**L.....L**LL**..
 b b bbbbbbb be e bbbb b bb ebbbbbbee e eee ee eee ebbbbb
 490 500 510 520 530 540
YLWVR**GQS**ALPAPAEFINTQ**GCY****G**AKIKLVDWTDWDPESTDVPRPDQFAT**G**VVAWRVSL
 SSPRO EEEEECCCCCCCCCHHHECCCCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCHHHHCCCEEEEEEECC
 PSIPRED HHHCCCCCCCCCCCCCEEECCCCEEEEEEEEEEEECCCCCHHCCCCCHHHHCCCEEEEEEE
 JPRED HHH-----EEEEEEEE-----EEEEEE-----
 PROF **.H**...L**LLLLLL**L.....**EEEEEE**...L**LLLLLL**L..L**LL**.....L..**EEEE**..
 bbbbbbb b bbbbbbbb bbbbb b b b ee e e ee eeb ebbbbb bbbbb
 550 560 570 580 590 600
 PT**G**LPT**G**PSNAADRQARRARS**G**AIALAQALNRARAF**G**E**G**ASPTMEVSDVPPDL**G**LAD**L****G**

Se observa que en las zonas próximas a algunas glicinas, en posiciones 40, 260, 400, 600 y 670, estas están acompañadas de aminoácidos flexibles (R, N, Q, E, P y S) que facilitan un entorno favorable para que se produzcan los giros.

En este punto, el complejo nivel de estructuración de las proteínas y la carencia de estudios biofísicos, impiden la elucidación de su estructura terciaria; sin embargo hoy en día, se puede estimar una posible estructura por la comparación con estructuras de proteínas ya caracterizadas. Para la proteína de la cápsida no se obtiene resultado alguno, ya que en la búsqueda de secuencias homologas a EfV1, no fue localizada ninguna proteína cuya estructura fuese conocida íntegramente por lo que no es posible obtener información de la estructura terciaria.

2. ORF2

- **Características del gen**

Este gen, al igual que ORF1 tiene un contenido en C+G del 62.32% que implica que la proteína que se derive de esta secuencia presente un número mayor de aminoácidos con estabilidad térmica (Tabla 19).

Tabla 19. Características de la secuencia nucleotídica de ORF2;

Nº de bases traducidas	2484	
Adenosina (A)	20.21 %	502
Guanina (G)	27.78%	690
Timina (T)	20.93%	520
Citosina (C)	31.08 %	772
A+T	37.64%	1022
C+G	62.32%	1462

- **Características de la estructura primaria de la posible proteína codificada por ORF2**

La traducción de la proteína RdRp codificada por ORF2 indica que la proteína tiene un total de 827 aminoácidos (Tabla 20).

Tabla 20. Características deducidas de la secuencia de aminoácidos de la posible proteína codificada por ORF2.

Peso molecular	90223.95 Daltons
Número de aminoácidos	827
Aminoácidos básicos (+) (K,R)	87
Aminoácidos ácidos (-) (D,E)	80
Aminoácidos hidrofóbicos (A,I,L,F,W,V)	312
Aminoácidos polares (N,C,Q,S,T,Y)	209
Punto isoeléctrico	8.427
Carga a pH 7.0	9.807

Con la secuencia primaria de aminoácidos se generaron representaciones de la variación de la hidrofobicidad a lo largo de la secuencia de la proteína (Apéndice II).

- **Función y homología de la posible proteína codificada por el ORF2**

Al buscar en bases de datos proteínas con secuencias similares al producto de ORF2, se obtuvo de nuevo un conjunto de proteínas de miembros de la familia *Totiviridae* asociados a hongos filamentosos como las proteínas más parecidas, apareciendo a continuación proteínas de miembros de otros miembros de la familia como serían los virus de *Leishmania* (Tabla 21).

Tabla 21. Lista de secuencias de proteína víricas con mayor similitud con el producto ORF2 de EfV-1.

DB:ID	organismo	Función	Longitud	Identidad %	Similitud %	Solapamiento	E0
Q9YXE4	<i>Sphaeropsis sapinea RNA virus 2</i>	RNA polimerasa RNA dependiente RNA	825	53.317	77.201	829	3e-154
Q8B5B7	<i>Coniothyrium minitans virus</i>	Posible RNA polimerasa RNA dependiente	829	53.846	73.798	832	1.5e-147
Q6GYC0	<i>Gremmeniella abietina RNA virus L2</i>	Posible RNA polimerasa RNA dependiente	825	50.363	74.455	826	3.8e-140
Q99AT3	<i>Gremmeniella abietina RNA virus L1</i>	Posible RNA polimerasa RNA dependiente	825	50.544	74.607	827	8.6e-140
Q9YXE6	<i>Sphaeropsis sapinea RNA virus 1</i>	RNA polimerasa RNA dependiente	838	35.294	62.118	850	6.5e-69
Q76L27	<i>Helicobasidium mompa n17virus</i>	RNA polimerasa RNA dependiente	845	35.833	63.056	720	9.3e-68
Q606I2	<i>Magnaporthe grisea virus 1</i>	Posible RNA polimerasa RNA dependiente	832	36.864	62.173	727	1.5e-66
Q98XW8	<i>Eimeria brunetti RNA virus</i>	RNA polimerasa RNA dependiente	884	33.935	61.161	775	3e-52
Q57044	<i>Helminthosporium victoriae 190S virus</i>	RNA polimerasa RNA dependiente	770	33.242	60.055	731	3.9e-48
Q83101	<i>Leishmania RNA virus 1-4</i>	RNA polimerasa RNA dependiente	878	31.516	61.569	752	7.1e-47
Q02382	<i>Leishmania RNA virus 1</i>	RNA polimerasa RNA dependiente	874	31.432	60.080	754	6.8e-46
Q83073	<i>Leishmania RNA virus 2</i>	RNA polimerasa RNA dependiente	777	31.058	59.610	718	7e-29

Todas las secuencias homólogas encontradas corresponden a proteínas RdRp víricas, lo que indica que probablemente el producto de ORF2 es una RdRp; la función de ésta enzima es llevar a cabo la polimerización de ribonucleótidos trifosfatos (rNTPs) dependiendo de un molde de RNA; éste proceso puede ser también catalizado en otros casos por diferentes enzimas y es fundamental para diversos procesos biológicos, pero en este caso lo es para la replicación de virus de RNA (Iyer, 2003).

En el caso de HvV190S, miembro de la familia *Totiviridae*, la transcripción es asimétrica (solo se genera la hebra +) y conservativa ya que el RNAbc del virus se mantiene y sirve como molde para generar la nueva hebra + que es liberada (Ghabrial y Havens, 1989). La transcripción y replicación *in vitro* en el virus ScV-LA de levadura ocurre de forma conservativa (Fujimura et al., 1986, 1988) así que cabe esperar que otros miembros de la familia sigan este mismo proceso.

En concreto, la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) de EfV1, muestra una alta similitud con las presentes en otros virus de RNA, debido fundamentalmente a la presencia de los ocho motivos conservados (Junjung et al., 2004); además, cabe esperar que esta similitud no solo se limite a la secuencia de aminoácidos, sino que repercuta en la estructura tridimensional de la proteína, ya que teniendo una función tan importante y concreta la estructura ha de ser similar, al igual que ocurre entre otras polimerasas.

- **Dominios conservados en la RdRp**

En los estudios de las proteínas RdRps de virus de RNAbc que infectan a eucariotas simples que están caracterizadas hasta ahora, se observa la presencia de ocho dominios conservados (Bruenn, 1993). Tras un análisis

comparativo de la secuencia de aminoácidos de ORF2 de EfV1 con las de las RdRps de virus de la familia *Totiviridae*, se pudieron detectar los ocho motivos conservados en esta proteína (Figura 20). Existen discrepancias respecto a la longitud final de los dominios conservados, como ocurre con el tercer dominio, en el que se ha observado que incluyendo un motivo de cuatro aminoácidos mas, parece conservarse de igual manera que el resto de los dominios (Bruenn, 2003).

Figura 20. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los ocho dominios conservados de la RpRd de EfV-1 y los otros 19 totivirus. Los residuos idénticos son mostrados con un asterisco y los similares muy conservados con dos puntos y un punto para los que se conservan menos. En el dominio VI se conservan los residuos universales GDD. La inclusión de IMNV, un giardiavirus, disminuye el porcentaje de similitud con el resto de miembros de la familia.

Similitud	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	AA' totales
Dominio	:	.	*	*	*	*	*,**	*	
LRV2-1	LRGRG	WAANGGH3R	GK3RLLL	DYDDFNSQHS	TLM3GHRATTFFINTILNTAYL	HUGDDVIF	EFLRV	YPARA	70
LRV1-4	LLCRG	WAANGGH3R	GKTRLLL	DYDDFNSQNT	TLM3GHRATSPINSULDRAYI	HUGDDILM	EFLRV	YLARV	70
LRV1-1	LLCRG	WAANGGH3R	GKTRLLL	DYDDFNSQNT	TLM3GHRATSPINSULNRAYI	HUGDDILM	EFLRV	YLARV	70
TUV	LLCRG	WSRSGSHYY	GKERFIY	DYDDFNSQNT	TLP3GHRATTFFINTVLNWCYT	CAGDDVIL	EFLRK	YPCRA	70
TUV11	LQCRG	WUKKGANHH	GKTRFIY	DYDDFNSQHS	TLP3GHRATTFFINSULNRAYL	HTGDDULL	EFLRL	YPARA	70
TUV3	LICRG	WCKAGSHHH	GKTRYIY	DYDDFNSQHS	TLP3GHRATTFFINSULNKAYL	HCGDDULL	EFLRL	YPSRA	70
ScV-L1	LMDRG	WVPGGSUHS	GKQRAIY	DYDDFNSQHS	TLL3GWRLLTTTNTVLNWAYM	HNGDDUMI	EFLRV	YLSRS	70
ScULa	LENGV	IMP6GSUHS	GKURAIY	DYDDFNSQHS	TLP3GWRLLTTTNTALNYCYL	HNGDDVFA	EFLRV	YLTRG	70
EfV1	LLCRD	WAUNGAGGG	GKTRAIF	DYDDFNSHRT	TLM3GHRCTTFFINSULNAUYU	HUGDDUTM	EFLRI	YLSRA	70

Dominios	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	AA'
Similitud	: .	* .	* *	* * .	:	. :	***:	* : *	Totales
<i>SsRV1</i>	LLGRA	WCVNGSQND	GKTRAIF	DFDDENSHHS	TLPSGHRGTTIVNSVLNAAYI	HTGDDVYI	EFLRM	YLARS	70
<i>CeRV2</i>	LQGRA	WCVNGSHTP	GKSRAIF	DYDDENSHHS	TLMSGHRGITTFVNSVLNAAYL	HTGDDVYI	EFLRM	YLPRA	70
<i>CeRV1</i>	LQGRG	WCVNGSQNR	GKNRAIF	DYDDENSHHS	TLMSGHRGTTTHINSVLNAAYI	HTGDDVYM	EFLRM	YLCRA	70
<i>Hv190S</i>	LQGRY	WCVNGSQNA	GKDRAIF	DYDNENSQHS	TLMSGHRATTFTNSVLNAAYI	HAGDDVYL	EFLRL	YLCRA	70
<i>CmRV</i>	LLGRD	WAVNGAHSG	GKTRAIF	DYDDENSHHT	TLMSGHRLTTYINSVCNEAYL	HVGDDVYL	EFLRV	YLARA	70
<i>GeRV1.1</i>	LLGRA	WAVNGAHSG	GKTRAIF	DYDDENSHHS	TLMSGHRGTTFINSVLNKAYL	HVGDDVYF	EFLRN	YFARA	70
<i>SsRV2</i>	LQGRA	WAVNGSQSG	GKTRAIF	DYDDENSHHS	TLMSGRRGTTYISSVLNEVYL	HVGDDVYL	EFLRL	YLARA	70
<i>Eh-RV1</i>	LQGRG	WCVGGAHNL	GKGRAIY	DYSDENSQHS	SLMSGHRATTYWNNSVLNAAYV	HVGDDVLI	EFLRV	YVARS	70
<i>UmvH1</i>	LYGRG	WLVSGSSAG	GKARAIF	DYPDENSMHT	GLYSGDRDTTLINTLLNIAYA	CHGDDIIT	EYLRI	CLARC	70

Dominios	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	AA'
Similitud	: .	* .	* *	* *	: .	***:	*:***	*	Totales
<i>SsRV1</i>	LLGRA	WCVNGSQND	GKTRAIF	DFDDFNSHHS	TLPSGHRGTTIVNSVLNAAIY	HTGDDVYI	EFLRM	YLARS	70
<i>CeRV2</i>	LQGRA	WCVNGSHTP	GKSRAIF	DYDDFNSHHS	TLMSGHRGITFVNSVLNAAIY	HTGDDVYI	EFLRM	YLPRA	70
<i>CeRV1</i>	LQGRG	WCVNGSQNR	GKNRAIF	DYDDFNSHHS	TLMSGHRGTTTHNSVLNAAIY	HTGDDVYM	EFLRM	YLCRA	70
<i>Hv190S</i>	LQGRY	WCVNGSQNA	GKDRAIF	DYDNFNSQHS	TLMSGHRATTTFNSVLNAAIY	HAGDDVYL	EFLRL	YLCRA	70
<i>CmRV</i>	LLGRD	WAVNGAHSG	GKTRAIF	DYDDFNSHHT	TLMSGHRLLTTYINSVCNEAYL	HVGDDVYL	EFLRV	YLARA	70
<i>CeRV/L1</i>	LLGRA	WAVNGAHSG	GKTRAIF	DYDDFNSHHS	TLMSGHRGTTFINSVLNKAYL	HVGDDVYF	EFLRN	YFARA	70
<i>SsRV2</i>	LQGRA	WAVNGSQSG	GKTRAIF	DYDDFNSHHS	TLMSGRGTTYISSVLNEVYL	HVGDDVYL	EFLRL	YLARA	70
<i>Fb-RV1</i>	LQGRG	WCVGGAHNL	GKGRAIY	DYSDFNSQHS	SLMSGHRATTWNSVLNAAIYV	HVGDDVLI	EFLRV	YVARS	70
<i>UmVH1</i>	LYGRG	WLVSGSSAG	GKRAIY	DYPDFNSMHT	GLYSGDRDTTLLINTLLNIAYA	CHGDDIIT	EYLRI	CLARC	70

Dentro de estos dominios además parece estar conservado algún aminoácido específico para los miembros de la familia. Es más, es muy probable que los dos primeros dominios, sean únicos para la familia *Totiviridae* (Bruenn, 2003) puesto que no aparecen en el resto de familias. Los motivos menos conservados son especialmente el 1 y el 5 (Poulos et al., 2006).

En referencia a los dominios encontrados en EfV1 y en otros virus de la familia, los dominios 6 y 7 muestran un porcentaje de identidad elevado con respecto a la que sería la secuencia consenso de los miembros de la familia por lo que dicha conservación implica una función importante de dichos dominios; es más, en el motivo 6 se localiza la secuencia GDD que es considerada universal para las RNA polimerasas (Jablonski et al., 1991). Sin embargo los motivos 3, 4 y 5 presentan un porcentaje de identidad moderado, mientras que los motivos 1, 2 y 8 parecen ser los menos conservados dentro de *Totivirus*.

Dentro de la familia *Totiviridae*, los miembros del género *Victorivirus* presentan mayor similitud entre ellos, manteniendo motivos muy similares (Tabla 22). Respecto a los integrantes del género hay que destacar los motivos localizados en el dominio 2 y 3 que parecen ser muy específicos del género. Esto parece importante, ya que sin tener en cuenta la secuencia completa del virus, sino tan solo 70 aminoácidos puede hacerse una clara agrupación de la familia, incluso del género *Victorivirus*, ya que para el género se conservan 41 aminoácidos, 24 varían entre dos opciones y únicamente 5 son diferentes, conservándose eso si, el lugar en el que van situados.

Tal vez en este punto, el conocimiento de la existencia de motivos exclusivos del género permita el diseño de oligonucleótidos, que conteniendo parte de estas secuencias conservadas, puedan ser empleados como sondas marcadas para determinar si es un *Victorivirus* o no aún sin conocer su secuencia. La viabilidad de esta propuesta está aún pendiente de comprobar.

Aparte de las ocho regiones conservadas (Figura 20), se ha podido detectar la presencia de dos motivos adicionales entre los dominios II y III. En EfV1 se localizan entre la posición 320 y 350 de la RdRp los motivos RRSW y KLEH (ver en la siguiente sección la Figura 21), siendo el segundo de ellos exclusivo de *Totivirus* y *Victorivirus* y podría ser considerado como una elongación del tercer dominio, RRSW puede ser considerado como un noveno dominio o como un motivo que forma parte del tercer dominio tal y como lo plantea Bruenn (2003).

En realidad no se conocen exactamente las funciones de cada uno de estos dominios estructurales, pero se piensa que realizan funciones relacionadas con la polimerización del RNA, la unión de rNTPs, de la cadena molde y del producto. Es destacable la presencia de una secuencia de aminoácidos que permanece casi invariable en todas las polimerasas, incluidas las RdRps: Gly-Asp-Asp (GDD); se ha sugerido que la presencia de estos dos aspartatos junto con dos iones metálicos divalentes, son imprescindibles en el proceso catalítico que dará lugar a una nueva cadena de RNA (Steitz, 1993); esto es confirmado con las observaciones realizadas en estructuras cristalinas de poliovirus, donde estos dos aspartatos ocupan una posición apropiada para la reacción catalítica (Hansen et al., 1997).

Tabla 22. Motivos conservados dentro de los ocho dominios para los miembros del género *Victorivirus*. En letra normal se marcan los aminoácidos que permanecen invariables y entre paréntesis y marcados en morado aquellos aminoácidos que no se conservan íntegramente sino que oscilan entre las dos opciones indicadas. Los guiones representan el hueco de un aminoácido no conservado.

DOMINIO	SECUENCIA CONSERVADA PARA TOTIVIRUS
I	L(Q/L)GR
II	W(A/C)VNG(S/A)(H/Q)
III	GKRAIF
IV	D(Y/F)D(D/N)FNS(H/Q)H(S/T)
V	TL(P/M)SG(H/R)R-(T/I)T(N/S)SV(L/C)N(A/V)Y
VI	HGDDVY
VII	EFLR
VIII	Y(L/F)RA

Realizando una comparación similar en todos los dominios conservados en la polimerasa para los *Totivirus* y *Victorivirus*, se puede observar que éstas regiones se distribuyen de una forma semejante en todas las secuencias ocupando un lugar dentro de ellas que variará únicamente por la longitud total de cada una de las secuencias; además se ha comprobado que, en general, las distancias entre todos ellos apenas presentan variaciones, es decir de nuevo existe una conservación tanto de la disposición de los motivos dentro de la polimerasa como de la distancia de los dominios entre sí (Tabla 23). Además en la comparación de todos los miembros de la familia, se ha localizado la presencia de glicinas entre los dominios, que serán las responsables de los giros entre los distintos dominios, es más, una vez superada la región de los dominios, las glicinas que aparecen también parecen mantenerse en la familia, permitiendo así pensar en la posibilidad de un plegamiento de la estructura terciaria similar en las polimerasas dentro de la misma familia.

- Estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos del ORF2 de EfV1

Tabla 23. Posiciones que ocupa cada uno de los dominios conservados dentro de la secuencia de aminoácidos y distancias existentes entre dominios conservados para cada uno de los miembros de la familia *Totiviridae*.

Virus	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII	
EFV1	223-227	67	294-302	51	353-359	56	415-424	46	470-490	16	506-513	35	548-552	10	562-566	
CmRV	224-228	67	295-303	51	354-360	56	416-425	47	472-492	16	508-515	35	550-554	10	564-568	
SsRV2	221-225	66	291-299	51	350-356	56	412-421	47	468-488	16	504-511	35	546-550	10	560-564	
GaRVL1	222-226	66	292-300	50	350-356	56	412-421	47	468-488	16	504-511	35	546-550	10	560-564	
GaRVL2	222-226	66	292-300	50	350-356	56	412-421	47	468-488	16	504-511	35	546-550	10	560-564	
Hv190S	242-246	62	308-316	47	363-369	56	425-434	46	480-500	16	516-523	35	558-562	10	572-576	
CeRV1	275-279	60	339-347	52	399-405	56	461-470	44	514-534	16	550-557	35	592-596	10	606-610	
SsRV1	241-245	62	307-315	52	367-373	56	429-438	46	484-504	18	522-528	34	562-566	9	575-580	
HmVL17	244-248	63	311-319	52	371-377	56	433-442	47	489-509	16	525-532	35	567-571	10	581-585	
ScVL1A	170-174	58	232-240	51	291-297	43	340-349	63	412-432	16	448-455	34	489-493	14	507-511	
ScVL a	307-311	59	370-378	42	420-426	62	488-497	47	450-470	114	584-591	34	625-629	12	641-645	
UmVH1	1142-1146	67	1213-1221	62	1283-1289	56	1345-1354	65	1419-1439	21	1460-1467	35	1502-1506	11	1517-1521	
LRV1-1	278-282	60	342-350	49	399-405	58	463-472	47	519-539	12	551-558	34	592-596	10	606-610	
LRV1-4	282-286	60	346-354	49	403-409	58	467-476	47	523-543	12	555-562	34	596-600	10	610-614	
LRV2-1	172-176	62	238-246	49	295-301	66	367-376	47	423-443	12	455-462	34	496-500	10	510-514	
GLV	345-349	66	415-423	42	465-471	55	526-535	57	592-612	16	630-637	35	672-676	10	686-690	
TVV3	159-163	61	224-232	39	271-277	50	327-336	43	379-399	11	410-417	29	446-450	10	460-464	
TVVII	247-251	60	311-319	39	358-364	50	414-423	43	466-486	11	497-504	29	533-537	10	547-550	
TVV	216-220	59	279-287	45	332-338	52	390-399	44	443-463	12	475-482	30	512-516	10	526-530	
Eb-RV1	269-273	61	334-342	53	395-401	58	459-468	48	516-536	16	552-559	35	594-598	11	609-613	
GLVC	320-324	66	390-398	42	440-446	55	501-510	57	567-587	18	605-612	35	647-651	10	661-665	
BftV-1	243-247	60	308-316	46	363-369	55	425-434	45	480-500	15	516-523	34	558-562	10	572-576	

Para realizar una predicción de las estructuras secundarias y de su accesibilidad al disolvente se realizaron búsquedas en paralelo con distintos programas y los resultados han sido comparados teniéndose en cuenta fundamentalmente la información aportada por PROF (Figura 21). Así se obtiene una estructura orientativa del ORF2.

Figura 21. Predicciones de estructura secundaria realizadas con los programas SSPPRO, PSIPRED, JPRED y PROF para la proteína RdRp de EfV1. En la primera línea aparece la secuencia de aminoácidos de la proteína; en las siguientes cuatro líneas se encuentran las predicciones proporcionadas por cada uno de los programas, y en la quinta línea, correspondiente a PROF, se han señalado las regiones consenso de los cuatro programas; en color azul en el caso de α -hélices (H) y púrpura de láminas β (E), Las letras C o L son indicadoras del cualquier otra conformación. En color rojo se marcan las glicinas, responsables de proporcionar más flexibilidad a las proteínas y que suelen aparecer en los giros. En esta quinta línea se marcan en negrita aquellas predicciones que presentan una fiabilidad mayor de 7 y que pueden ser tomadas como referencia (correspondientes al programa PROF). Se señalan en color verde los ocho dominios conservados típicos de las RdRps. Las regiones marcadas en azul oscuro y amarillo corresponden a dos regiones que también están conservadas dentro de la familia *Totiviridae*, en concreto el amarillo es un dominio exclusivo de los *Totivirus* y *Victorivirus*. En la sexta línea se muestra la accesibilidad del disolvente (e= residuos expuestos al disolvente y b= residuos no expuestos al disolvente).

	MIESTVADRANAAG	SVGRYLEALLPSEYTRVVS	TLPF	HDQVSFVYRPSWRHHKPT	ELQ	RV
SSPRO	CCCCCHHHHHHHCCHHHHHHHHHHCCHHHHHHHHCECCHHHHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHH					
PSIPRED	CCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCHHHHCCCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCCHHHH					
JPRED	----HHHHHHHHH-HHHHHHHHH-----EEE-----HHHEEEEEEE-----HHHH					
PROF	HHHHHHHH	HHHHHHHH	EEEE	EEEEE	HHHH	
	e ee beebbebbb	bb bbeebbe	ebbe	bb bebe	bbbbbb b bee	b bbbb
	10	20	30	40	50	60

CAPÍTVLO iV 137

En la estructura secundaria predicha para la RdRp se puede observar la presencia de bastantes hélices alfa; además las predicciones realizadas en la región correspondiente a zona de los motivos conservados en la familia *Totiviridae* pueden ser comparadas con estructuras ya definidas de otras RdRp (aunque caracterizadas de forma más completa), y así comprobar las

coincidencias con miembros no pertenecientes a esta familia. En las RdRps seleccionadas para esta comparación se observa que los motivos conservados tienden a quedar en regiones entre láminas beta o alfa hélices que parecen estar igualmente conservadas y cuyas posiciones y longitud total permanecen incluso a pesar de que su secuencia primaria es diferente. Realmente se realiza una comparación entre las estructuras secundarias deducidas anteriormente y las estructuras tridimensionales que están disponibles para la RdRps de Phi6 (bacteriófago de RNA), HCV virus de la hepatitis C que es un *flavivirus*, y de RHDV, virus de la enfermedad hemorrágica de conejo (Bruenn, 2003); en todas estas estructuras a pesar de no presentarse residuos idénticos entre ellos, se han detectado residuos conservados en los motivos estructurales presentes en todas las RdRps y también una similitud en un primer plegamiento tridimensional que podría repercutir en el posterior plegamiento de la estructura protéica (Bruenn, 2003). En la comparativa particular con EfV1 se observa que comparte con todos ellos los seis dominios conservados y presenta además dos más que son exclusivos de la familia *Totiviridae*. Lo que se ha observado para la región donde se encuentran los dominios conservados, es que en todos ellos se repite una secuencia concreta de estructuras de plegamiento inicial, es decir, que teniendo en cuenta que hemos numerado los dominios del 1 al 8 y partiendo desde el dominio número 3, (primer dominio común de la RdRp de EfV1 con el resto de RdRp no pertenecientes a la familia *Totiviridae*), se repite la secuencia estructural indicada en la Figura 22. E

Figura 22. Patrón de la estructura secundaria entre dominios conservados en la RdRp de EfV1 y otros virus.

Dominio 3 (A) - 2 α hélices + 1 lámina β - **Dominio 4 (B)** - 1 α hélice + 1 lámina β -
Dominio 5 (C) - 1 lámina β + 1 α hélice - **Dominio 6 (D)**

Pero no es solo la coincidencia de encontrar los mismos motivos estructurales, sino también el tramo de secuencia de aminoácidos existente entre dominios presenta una longitud similar en todos ellos (ver Tabla 23), lo que implicaría que dicha distancia es importante en la conservación de la estructura, sobre todo con la finalidad de realizar una misma función. La otra similitud es que no solo existe la posibilidad de encontrar esas estructuras entre dominios, sino que entre cada una de estos posibles estructuras se han detectado aminoácidos que podrían permitir giros en la secuencia de aminoácidos de EfV1 (glicinas marcadas en rojo) y adquirir así una estructura tridimensional similar a la propuesta para las otras RdRps.

Tabla 23. Número de aminoácidos existentes entre los dominios conservados de las distintas RdRp; Las distancias entre dominios son parecidas aunque no iguales, sin embargo si son considerados los miembros de la familia *Totiviridae* la similitud incluye el tamaño de los dominios y la separación entre ellos.

Virus	Distancia 3-4	Distancia 4-5	Distancia 5-6
EfV1	56	46	16
HCV	53	24	21
Phi 6	60	48	18
RHDV	48	34	17

El hecho de encontrar todas estas similitudes con EfV1, permite presuponer que la estructura tridimensional final de esta región (correspondiente a una zona de unos 250 aminoácidos) sería muy similar a las propuestas para las otras RdRp; a falta claro está, de una comprobación más exhaustiva por medio de un estudio estructural de su estructura terciaria.

- **Estructura terciaria de la secuencia de aminoácidos del ORF2 de EfV1**

Ya en este punto, el complejo nivel de estructuración de las proteínas y la carencia de estudios biofísicos de esta secuencia, impiden la obtención de su estructura terciaria; sin embargo hoy en día, se puede estimar una posible estructura por la comparación con estructuras de proteínas ya caracterizadas. El objetivo del modelado molecular es construir la estructura terciaria que le corresponde a la secuencia de aminoácidos a partir de una proteína molde con estructura cristalográfica conocida. La calidad del modelo va a depender en gran medida del porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos. El alineamiento es sencillo cuando el porcentaje de identidad es igual o mayor que 40%; cuando el porcentaje de identidad es del 30 al 40%, se presentan diferencias estructurales más grandes. Si el porcentaje de identidad entre las secuencias está por debajo del 20%, uno de los principales problemas es el de la identificación del molde. Para llegar a la consecución de una estructura terciaria se parte de las proteínas homólogas ya identificadas y se determina el porcentaje de similitud (BLAST, FASTA). Se alinean las secuencias (CLUSTAL X) y se identifican las regiones conservadas y variables (como hemos visto esto ha sido realizado). Posteriormente se generan las coordenadas para las regiones conservadas de la proteína de interés (MODELLER, Swiss-Model) en función al

grado de homología obtenido. Por tanto si se parte de un homólogo en PDB (ya sea lejano o no), se realiza el modelado comparativo y se obtiene el modelo tridimensional. Adicionalmente se emplea la predicción tridimensional sin estructura homóloga por medio del programa Rosetta.

En éste caso se emplea únicamente la región correspondiente a los dominios conservados, ya que es la región donde es posible encontrar estructuras semejantes con un mayor porcentaje de identidad.

Cuando se procede a la búsqueda de homólogos en las bases de datos se llega hasta una secuencia con la cual se muestra un anillamiento significativo. A la vista de los resultados conseguidos (Figuras 23 y 24) las estructuras tridimensionales de la proteína del ORF2 parecen similares en ambos programas, pero la información que ofrecen parece insuficiente como para determinar un esbozo de la estructura tridimensional de la proteína ya que el resultado se limita únicamente a la región de dominios conservados, y además no se dispone de ningún dato biofísico que corrobore las hipotéticas estructuras.

Figura 23. Modelo propuesto por Swiss-model para la región de los dominios conservados de la proteína del ORF2 de EfV1. El homólogo con mayor identidad procede del virus del RdRp de un picornavirus, en concreto el virus responsable de la fiebre aftosa en ganado. La región tomada para realizar el estudio corresponde a una zona de 362 aminoácidos en la que se incluyen los ocho dominios conservados.

Figura 24. Análisis comparativo realizado con CHPmodels 2.0 de la secuencia correspondiente a la región donde están los dominios conservados de la RdRp; el anillamiento de estructuras con la secuencia de EfV1 muestra la siguiente estructura como resultado con mayor identidad, en éste caso es del 24.1%. Las tres figuras corresponden a la misma estructura con un ángulo de giro diferente. En rosa se marcan las α -hélices y en amarillo las láminas β .

Estructura de las de regiones no traducidas del genoma de EfV1

1. UTR5'

En el genoma de EfV1 la región UTR 5' está situada en el extremo distal al ORF1. El UTR5' tiene 270 nucleótidos y un contenido de GC del 56.7%. Se ha localizado una secuencia conservada (AGGGUCC) en la región UTR 5', esta secuencia no está en todos los miembros de la familia *Totiviridae*, únicamente en GaRVL1, GaRVL2, SsRV2, CmRV, HmV17, SsRV1, GLV, GCV y BfTV1. La posición es variable, estando en la mayoría de los casos a 43 nucleótidos del codón de inicio de la proteína de la cápsida, y en el resto de casos cercana a ese punto. Sin embargo en Hv190SV, la secuencia no es exactamente igual, sino parecida: GGCCUCC y se localiza en una posición similar.

La estructura de la región 5' UTR fue predicha con el programa M-Fold (Zuker, 1999), obteniéndose el resultado mostrado en la Figura 26. El resultado refleja la complejidad de la zona, pero no existe una diferenciada que sea común a las que aparecen en la misma región de los miembros de la familia.

2. UTR3'

La región 3' posee una longitud menor a la 5' con un tamaño de 58 nucleótidos, y con un contenido de GC del 55.2%. En este caso los tres clones obtenidos coincidieron en una misma terminación y hay que destacar que esta región no presenta poliadenilación.

Las regiones UTR son analizadas con el programa M-Fold (Zuker, 1999), obteniéndose las estructuras mostradas en las Figuras 25 y 27. En el caso de la región 3', la única estructura posible muestra una estructura con dos brazos muy similar a la que se presenta en ScV-LA, en cuyo caso esta estructura es esencial, junto con la secuencia terminal AUGCA, para la replicación (Wickner, 2002) (Figura 25 B).

Figura 25. A. Estructura secundaria del UTR 3' de EfV-1. El codón de terminación del ORF-2 queda marcado en negrita. B. Estructura del UTR 3' correspondiente a ScV-LA.

A.

B.

Figura 26. Estructuras secundarias de la región UTR 5' resultado obtenido con el programa M-FOLD (Zuker, 1999).

Las regiones 5' y 3' de EfV1, quedan dentro del rango de tamaños descritos para ambas regiones en el género *Victorivirus* (Ghabrial y Nibert, 2009).

Análisis de la zona de solapamiento entre ORF1 y ORF2

EN EfV1 los dos ORFs presentes están solapados por cuatro nucleótidos en la secuencia AUGA, que corresponde a la unión del codón de terminación del ORF1 y el codón de inicio del ORF2. El solapamiento produce un desfase o frameshift de -1 del ORF2 respecto al ORF1. La presencia del tetranucleótido AUGA y el frameshift también ocurre en otros miembros de la familia *Totiviridae* tal y como queda resumido en la tabla 25.

La característica organización genómica que se presenta en *Totiviridae* contiene dos ORFs en su genoma, el ORF 5' proximal codifica una CP y el ORF de 3' codifica una RNA polimerasa-RNA dependiente (RDRP). La disposición de estos ORFs puede presentarse de tres maneras dentro de la familia *Totiviridae*:

- El ORF2 se solapa con el ORF1 en fase -1 (ocurre en SsV-L-A, SsV-La, Hv190 sV y GLV) (Huang y Ghabrial, 1996).
- Los dos ORFs se solapan en fase +1 (como en LRV1-1, LRV-4 y TVV) (Ghabrial y Patterson, 1999).
- No hay ningún solapamiento entre ambos ORFs, que están separados por un codón de terminación (como en LRV-2-1) (Ghabrial y Patterson, 1999).

La traducción de la RDRP puede realizarse como una proteína de fusión (como es la Gag-pol-like para ScV-L-A) (Bruenn, 1993) o como un polipéptido no fusionado, como ocurre en Hv190SV, SsRv1 y SsRV2 (Paul et al., 2001).

En los ORFs solapados la región común a ambos puede ser variable, desde un nucleótido (como que se presentan en su mayoría), 16 nucleótidos en TVV, o hasta los 130 nucleótidos en el caso de ScV-L-A (Bruenn, 1993). En este último caso, la región solapada contiene estructuras que son necesarias para el "frameshifting" ribosomal, como son un "slippery site", señal que impide el progreso de los ribosomas y que presentan una secuencia consenso X XX Y YYZ, cuyos espacios marcarían el primer marco de lectura abierto y en algunos casos X puede ser igual a Y como ocurre en el virus HIV-1 (Jacks et al., 1988) y una estructura de pseudonudo que incluye un "stem-loop" (Cheng, 2003; Bruenn, 1993). Sin embargo, en los genomas de HV190SV, SsV1 y SsRV2 y HmTv1-17, no existe un silenciador heptamérico, ni un pseudonudo, lo que supone que la expresión de RdRp podría ocurrir de distinta manera al "frameshifting" traduccional del caso anterior. Por esta razón se ha sugerido un mecanismo diferente de traducción que sería de traducción interna, porque el codón de terminación del ORF de CP se solapa con el codón de iniciación del ORF de RDRP. Ambos codones quedan solapados dentro del tetranucleótido AUGA (Buck 1986;

Paul et al., 2001). Si este tetranucleótido está conservado, puede que desempeñe un papel importante en la reiniciación de la traducción.

Pero no en todos los totivirus sucede esto mismo, es interesante observar que en CeRV1, unos 40 codones antes del codón de inicio de ORF2, se presenta un codón stop en el mismo marco de lectura abierta; algo similar ocurre en los casos de SsRV1 (donde existe un codón de finalización a 8 nucleótidos) y en SsRV2 donde el condón de finalización se encuentra a una distancia de 12 nucleótidos (Preisig et al., 1998), curiosamente todos estos casos presentan el tetranucleótico AUGA, un frameshift +1 y una región solapada. Tal vez la presencia del tetranucleotido AUGA, aunque no tiene la misma función que en los casos enumerados anteriormente, si parece conservarse en una región intermedia del genoma del virus, esto puede ser por que a pesar de que el virus posee un sistema de frameshift +1, en el caso de éste no fuera funcional, por un algún error, podría emplearse el tetranucleótido AUGA que esta en una posición que daría lugar al frameshift -1, convirtiéndose así en la expresión de una nueva especie diferente de la que se ha partido. Ésta hipótesis de una idea de cómo a lo largo del tiempo pueden ir generándose las distintas especies.

Tabla 25. Miembros de la familia *Totiviridae* en los que se produce frameshift +1 junto con una región de solapamiento mayor (de 7nt para SsV2 y SsV1 y de 22nt para CeRV1) sin la presencia del tetranucleótido AUGA. Sin embargo en estos casos existe la presencia de un tetranucleótido AUGA en la región central del genoma sin que en él se produzca el frameshift traduccional. La localización del tetranucleótido en cada uno de ellos permitiría un frameshift -1, en caso de que se produjera el frameshift en ese punto. En caso de producirse este hecho, existiría mayor semejanza con respecto a resto de los miembros de la familia.

Especie	Tamaño del genoma	Posición de AUGA	Región solapada	Frameshift
Sphaeropsis sapinea RNA virus 2	5261	2661	2658-2665	+1
Sphaeropsis sapinea RNA virus 1	5163	2573	2574-2581	+1
Thielaviopsis basicola RNA virus 1	5310	2618	2619-2641	+1

Según algunos autores los virus que infectan a hongos filamentosos parecen representar un grupo distinto de totivirus que comparten la característica de traducir RdRp como una proteína no fusionada y una región rica en prolinas C-terminal (Dokland, 2000).

3. Estructura secundaria de la zona de solapamiento entre ORFs

En EfV1 la región del solapamiento entre ORFs fue difícil de clonar usando oligonucleótidos al azar, esto pudo ser debido a la presencia de estructuras secundarias que pueden inhibir el anillamiento de los oligonucleótidos al azar, o la elongación de la cadena de cDNA por medio de la transcriptasa inversa. Los frameshift ribosomales surgen cuando existen estructuras que los favorecen como un "slippery site" y/o pseudonudos que suelen aparecer en la región solapada entre ORFs o en zonas cercanas (Icho y Wickner, 1989 y Wang et al., 1993).

Los análisis con MFold y RNAshapes para determinar la presencia de algún tipo de estructura secundaria muestran dos estructuras similares con energía libre mínima (Figura 27), sin embargo dichas estructuras no permiten a priori la formación de pseudonudos por lo que se decidió hacer una búsqueda de posibles estructuras secundarias alternativas por medio de programas que siguen diferentes criterios y permiten la predicción de pseudonudos.

Figura 27. Representaciones estructurales de una región de 82nt que engloba a la zona de solapamiento de ambos ORFs en EfV1. Con los programas Mfold y RNAshapes se obtienen dos estructuras iguales con energía libre mínima.

Energía libre	Mfold	RNAshapes
dG=-31.6
dG=-31.00

En EfV1, después se realiza otro estudio de la estructura secundaria de la región de 82 nucleótidos en torno al tetranucleótido, donde se consiguió obtener una estructura bastante estable (Figura 28). Información obtenida según el servidor de predicción de estructura secundaria y pseudonudos de RNA: vsfold5 www.rna.it-chiba.ac.jp/~vsfold5 (Dawson et al., 2007). En ambos casos se

obtuvieron unas estructuras que tienen una energía libre mayor que las referidas anteriormente, lo que implica que su formación sea menos probable.

Figura 28. A Representación estructural de una región de 82nt cercana a la zona de solapamiento de ORFs, en la que se observa una misma estructura secundaria estable de RNA, con la presencia de diferentes pseudonudos: Ambas estructuras son obtenidas con modificaciones de distintos parámetros; así la figura A es obtenida con los valores predeterminados por defecto cambiando la mínima longitud de las bases apareadas a un total de 4pb. En el caso de la figura B se obtiene variando la longitud mínima de cada rama a 3pb, la Kuhn length se establece en 4 nt y la mínima longitud de las bases apareadas se deja en 4 pb. En rojo se marcan los nucleótidos que se aparean dando lugar a la formación de pseudonudos. B. Representación lineal de las posibles estructuras presentes en la zona de solapamiento de EfV1 y determinadas con vs-fold5, donde ve claramente la posición del tetranucleotido que queda en una zona intermedia sin formar parte de ninguna estructura. El emparejamiento de bases que formarán los pseudonudos, está marcado con paréntesis y con corchetes rojos las bases.

A

Estructura A	Estructura B

$dG_{total} = -33,59 \text{ Kcal/mol}$	$dG_{total} = -42,86 \text{ Kcal/mol}$

1993). Anteriormente los virus de la familia *Totiviridae* estaban subdivididos en tres géneros: *Totivirus*, *Giardiavirus* y *Leishmaniavirus*. El primer género infecta a hongos filamentosos y levaduras, mientras que los otros dos géneros infectan a parásitos de protozoos. Sin embargo, la caracterización de EfV1 y otros nuevos micovirus dentro de esta familia han permitido establecer un nuevo género denominado *Victorivirus* en el que solo se incluyen virus de hongos filamentosos (Ghabrial y Niebert, 2009).

Para estimar la relación filogenética de EfV1 con el resto de miembros de la familia *Totiviridae* fueron alineadas las secuencias de las proteínas derivadas de los dos ORF, así como las de los ocho motivos conservados de la RdRp con otras pertenecientes a otros virus de la familia. Todas las secuencias presentan una identidad de al menos 50% con EfV1 (Figura 29). Los alineamientos han permitido generar suficiente información para realizar varios árboles filogenéticos en los que EfV1 aparece agrupado con GaRVL1, CmRV, CeRV1, CeRV2, SsRV2, SsRV1 y Hv190s (figuras 29, 30 y 31), todos estos virus infectan hongos filamentosos. La topología de los árboles filogenéticos realizados fue muy semejante independientemente del algoritmo empleado (UPGMA, Neighbour-joining, Máximo likelihood o Máximo parsimony), mostrándose en las figuras 30, 31 y 32, los árboles obtenidos por agrupamiento de secuencias según el método UPGMA.

La relación filogenética entre los miembros de la familia, empleando las secuencias completas de aminoácidos correspondientes a la RdRp es muy similar a la obtenida únicamente con los dominios conservados de esta proteína (Figura 32). Esto se debe a que los motivos conservados presentan unas posiciones que se mantienen porque desempeñan funciones importantes, y otras variables que conllevan una diversidad suficiente como para establecer las diferencias entre las distintas especies miembros de la familia.

En el caso de la proteína de la cápsida el agrupamiento de las distintas especies de la familia es bastante similar al observado con la secuencia completa del virus o al realizado con la proteína RdRp (Figura 31). En el clado de los Victorivirus aparecen EfV1 y el resto de miembros del género. En todos los géneros los miembros aparecen agrupados excepto en el género *Totivirus*, cuyos miembros parecen estar distantes en cualquiera de los análisis realizados. Esto puede indicar que aunque sus miembros de momento están clasificados dentro del mismo género es probable que con la aparición de nuevos virus en este género aparezca una nueva subdivisión.

En este trabajo los análisis filogenéticos se han realizado con las secuencias de aminoácidos obtenidas para las dos proteínas de EfV1, pero si se realiza el análisis empleando secuencias nucleotídicas, los agrupamientos obtenidos son similares (datos no mostrados).

Figura 30. Árbol filogenético construido con las secuencias completas de las proteínas de la cápsida de miembros de la familia Totiviridae que actualmente están reconocidos (ver apéndice I) y la secuencia correspondiente de EfV1. El árbol fue realizado con el método UPGMA. Los valores de "bootstrap" aparecen marcados en cada rama.

Figura 31. Árbol filogenético construido con las secuencias completas de las RdRps de miembros de la familia *Totiviridae* actualmente reconocidos (ver apéndice I) y la secuencia correspondiente de EfV1; el árbol fue realizado con el método UPGMA; Los valores de "bootstrap" son superiores a los que se obtienen únicamente con las secuencias de los dominios conservados.

Figura 32. Árbol filogenético construido con las secuencias correspondientes a las ocho regiones conservadas de las RDRPs de miembros de la familia *Totiviridae* actualmente reconocidos (ver apéndice I) y la secuencia correspondiente a EfV1; el árbol fue realizado con el método UPGMA; en éste se puede observar el agrupamiento en totivirus de protozoos, de levaduras y de hongos filamentosos. Los valores de "bootstrap" están indicados en cada una de las ramas.

Para complementar éste análisis filogenético de EfV1, adicionalmente se han realizado matrices de comparación para cada par de secuencias de aminoácidos de los distintos miembros de la familia *Totiviridae*, en las que se representa el porcentaje de similitud existente entre ellas (Figura 33).

Figura 33. Matriz de semejanza de las secuencias de aminoácidos correspondientes a los dominios conservados de la proteína RdRp en los miembros de la familia *Totiviridae* (A). En la segunda matriz son comparadas las secuencias de los aminoácidos correspondientes a la proteína de la cápsida (B). En amarillo se marca la similitud de EfV1 con el resto de miembros de la familia *Totiviridae*. Se marcan en naranja los miembros del género *Victorivirus* incluido EfV1. En morado se marcan los porcentajes de similitud entre los miembros del género *Victorivirus*. En la primera de ellas son representadas únicamente las regiones correspondientes a los motivos conservados de la polimerasa, porque como hemos visto son representativos de la secuencia total de la proteína polimerasa; por tanto la búsqueda de residuos iguales se realiza dentro de los 70 aminoácidos conservados. En la segunda de las matrices se comparan las secuencias completas de aminoácidos correspondientes a la cápsida de miembros de la familia. En ambos casos los números representan el porcentaje de similitud que existe entre cada uno de los miembros comparados, y es evidente que el grado de similitud sea elevado en la matriz de motivos conservados con respecto a los resultados que da la proteína entera. Y una vez más, se observa como los valores mayores corresponden a los miembros del género *Victorivirus*, esta elevada similitud puede ser una muestra de su procedencia de un ancestro común.

A

	ScVL _a	ScVL1A	TVV3	TVV7	TVV	LRV1-1	LRV1-4	LRV2-1	SsRV1	SsRV2	CeRV1	CeRV2	Hv190S	CmRV	GaRVL1	EfV1	Eb-RV1	UmVH1	GLV	GLC
ScVL _a	-																			
ScVL1A	74	-																		
TVV3	57	67	-																	
TVV7	56	66	89	-																
TVV	54	63	74	74	-															
LRV1-1	54	61	69	70	64	-														
LRV1-4	53	60	67	69	63	99	-													
LRV2-1	59	60	67	69	64	77	76	-												
SsRV1	56	64	66	66	59	66	64	60	-											
SsRV2	54	60	67	69	59	67	66	64	76	-										
CeRV2	56	64	69	69	60	64	63	64	83	77	-									
CeRV1	54	64	69	69	63	70	69	64	84	79	84	-								
Hv190S	56	64	71	70	66	67	66	63	77	76	79	84	-							
CmRV	54	61	67	70	63	74	73	69	73	84	74	74	73	87	-					
GaRVL1	54	61	71	73	63	73	71	73	77	84	80	77	73	87	-					
EfV1	54	61	64	64	61	70	69	61	74	79	74	77	74	83	81	-				
Eb-RV1	54	67	70	73	61	67	66	67	70	66	70	71	71	70	70	67	-			
UmVH1	47	56	54	54	60	56	54	53	54	56	53	57	53	57	56	56	56	-		
GLV	39	36	40	40	41	39	37	36	39	39	34	34	39	39	37	34	37	39	-	
GLC	39	36	40	40	41	39	37	36	39	39	34	34	39	39	37	34	37	39	-	

B

	ScVL _a	ScVL1A	TVV3	TVV7	TVV	LRV1-1	LRV1-4	LRV2-1	SsRV1	SsRV2	CeRV1	Hv190S	CmRV	GaRVL1	EfV1	Eb-RV1	UmVH1	GLV	GLC	GaRVL2	HmVL-17	ZScbVZ
ScVL _a	-																					
ScVL1A	17	-																				
TVV3	10	12	-																			
TVV7	11	11	31	-																		
TVV	11	10	18	21	-																	
LRV1-1	10	10	11	11	12	-																
LRV1-4	11	11	11	11	12	91	-															
LRV2-1	11	13	12	9	13	35	35	-														
SsRV1	13	12	12	13	14	16	15	18	-													
SsRV2	12	14	13	13	14	16	17	18	36	-												
CeRV1	13	11	12	11	11	16	17	17	44	33	-											
Hv190S	13	12	12	14	12	18	18	18	48	35	45	-										
CmRV	10	12	11	12	13	17	18	19	35	55	31	34	-									
GaRVL1	13	11	12	11	13	17	17	20	34	61	33	35	60	-								
EfV1	12	14	12	12	13	16	16	17	33	55	30	33	54	56	-							
Eb-RV1	11	12	12	12	11	17	16	19	22	25	21	24	23	24	24	-						
UmVH1																	-					
GLV	12	11	11	11	12	13	13	13	11	12	12	11	11	14	13	12		-				
GLC	11	10	11	11	12	12	12	13	11	11	13	11	11	10	13	12		91	-			
GaRVL2	13	11	12	13	13	17	17	18	34	59	33	34	60	98	56	24		13	11	-		
HmVL-17	12	12	13	13	13	18	17	18	35	32	34	38	30	31	31	23		12	12	31	-	
ZScbVZ																				12		-

En éste nuevo género, todos sus miembros parecen tener un origen común que necesariamente implica la existencia de un ancestro común para todos ellos; un ancestro que, gracias a posibles transmisiones interespecíficas, fue modificándose para adaptarse a las nuevas especies hospedadoras de hongos filamentosos.

Por tanto el conocimiento de la estructura del genoma, sus características moleculares, junto con un análisis filogenético completo permiten confirmar la clasificación de EfV1 como un miembro de la familia *Totiviridae*, género *Victorivirus*.

IV. Conclusiones

- i. El genoma completo de EfV1 consiste de 5109 nucleótidos y contiene dos ORFs. El ORF1 codifica una posible proteína de la cápsida y ORF2 una posible polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp). Ambos ORFs están solapados en un tetranucleotido AUGA, lo que implica la existencia de un cambio de fase de lectura de -1 para la traducción de ORF2.
- ii. En la proteína de la cápsida se han localizado tres dominios que parecen estar conservados en miembros de la familia *Totiviridae*. En el ORF2 de EfV1 se han localizado los ocho dominios conservados en RdRp de virus de dsRNA, pero además se han detectado otros dos dominios que parecen conservados al menos dentro de esta la familia *Totiviridae*.
- iii. Árboles filogenéticos contruidos con secuencias de aminoácidos tanto de la proteína de cápsida como de la RdRp incluyen a EfV1 en un clado junto con otros miembros de la familia *Totiviridae* que infectan hongos filamentosos. Este clado es el del género *Victorivirus*.
- iv. Tanto las características del genoma de EfV1 (tamaño, número de ORFs, frameshifting -1), como el análisis filogenético, muestran que EfV1 pertenece a la familia *Totiviridae* y al género *Victorivirus*.

V. Bibliografía

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer A. (1997). Gapped BLAST and PSIBLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Andino, R., Rieckhof, G.E., Baltimore D.A. (1990). A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5 end of poliovirusRNA. *Cell* 63: 369-380.
- Argos, P. (1988). A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Research* 16: 21 9909-9916.
- Baldi, P., Brunak, S., Frasconi, P., Soda, G., Pollastri G. (1999). Exploiting the past and the future in protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* 15: 937-946.
- Bink, H. H., Hellendoorn, K., Van der Meulen, J., Pleij, C.W. (2002). Protonation of non-Watson-Crick base pairs and encapsidation of turnip yellow mosaic virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 13465-13470.
- Bradshaw, A.D. (1959). Population differentiation in *Agrostis tenuis* Sibth II: the incidence and significance of infection by *Epichloë typhina*. *New Phytologist* 58: 310-315.
- Bruenn, J.A. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic. Acids Research* 31, 7:1821-1829.
- Bruenn, J.A. (1993). A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. *Nucleic. Acids Research* 21: 5667-5669.
- Buck, K.W. (1986). En *Fungal Virology*. (Buck, K. W., Ed.) pp 1-84. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Butcher, S.J., Grimes, J.M., Makeyev, E.V., Bamford, D.H. Stuart, D.I. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature*, 410: 235-240.

- Castón, RJ, Luque D, Trus BL, Rivas G, Alfonso C, González JM, Carrascosa JL, Annamalai P, Ghabrial S.A. (2006). Three-dimensional structure and stoichiometry of Helminthosporium victoriae 190S totivirus. *Virology* 347: 323-332.
- Chen, J., Noueiry, A., Ahlquist P. (2001). Brome mosaic virus Protein 1a recruits viral RNA2 to RNA replication through a 5 proximal RNA2 signal. *Journal of Virology* 75: 3207-3219.
- Cheng, J., Jiang, D-H., Fu, Y., Li, G., Peng, Y., Ghabrial S.A. (2003). Molecular characterization of a RNAbc totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. *Virus Research* 93: 41-50.
- Cuevas, J.M., Domingo-Calap, P.; Pereira-Gómez, M., Sanjuán R. (2009). Experimental evolution and population genetics of RNA viruses. *The Open Evolution Journal* 3: 9-16.
- Cuff, J.A., Clamp M.E., Siddiqui A.S., Finlay M., Barton G.J. (1998). Jpred: A consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics* 14: 892-893.
- Dawson, W, Fujiwara K, Futamura Y, Yamamoto K, Kawai G. (2006). A method for finding optimal RNA secondary structures using a new entropy model (vsfold). *Nucleotides, Nucleosides, and Nucleic Acids* 25: 171-189.
- Dawson, W, Fujiwara K, Kawai G. (2007). Prediction of RNA pseudoknots using heuristic modeling with mapping and sequential folding. *PLoS One* 2: 905.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., Argos G. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Engineering* 3: (6) 461-467.
- Dokland, T. (2000). Freedom and restraint: themes in virus capsid assembly. *Structure with Folding & design* 8, R157-R162.
- Ferrer-Orta, C., Arias A, Agudo R, Perez-Luque R, Escarmis C, Domingo E, Verdaguer N. (2006). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J.* 25: 880-888.

- Frohman, M.A., Dush M.K., Martin G.R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts by amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 8998-9002.
- Fujimura, T., Esteban, R., Wickner, R.B. (1986). In vitro L-A double-stranded RNA synthesis in virus-like particles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 83: 4433-4437.
- Fujimura, T., Esteban, R., Wickner, R.B. (1988). Double-stranded RNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic control and in vitro replication. *En Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes*, pp. 91-115. Edited by Y. Koltin & M. J. Leibowitz. New York: Marcel Dekker.
- Gallie, D.R. (2001). Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *Journal of Virology* 75: 12141-12152.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., Bairoch, A. (2003). ExPASy—the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31: 3784-3788.
- Ghabrial, S.A., Nibert, M.L. (2009). Victorivirus, a new genus of fungal viruses in the family Totiviridae. *Archives of Virology* 154: 373-379.
- Ghabrial, S.A., Havens, W.M. (1989). Conservative transcription of *Helminthosporium victoriae* 190S virus RNAbc in vitro. *Journal of General Virology* 70: 1025-1035.
- Ghabrial, S. A., Patterson J.L. (1999). Totivirus (Totiviridae).: General features. pp. 1808-1817. In *Encyclopedia of virology*, A. Granoff and R. G. Wester, eds.) 2nd ed. Vol. 3, pp 1808-1812, Academic Press, San Diego.
- Ghabrial, S.A, Soldevila, A.I, Havens, W.M. (2002). Molecular genetics of the viruses infecting the plant pathogenic fungus *Helminthosporium victoriae*. In:

Tavantzis S (Ed) Molecular biology of double-stranded RNA: concepts and applications in agriculture, forestry and medicine. CRC Press, Boca Raton, pp 213-236

-Grimes, J.M, Bourroughs, J.N, Gouet, P, Diprose, M., Malby, R, Ziéntara, S., Mertens, P.C., Stuart, D.I. (1998). The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature* (London). 395: 470-478.

-Hansen, J.L., Long, A.M., Schultz, S.C. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* 5: 1109-1122.

-Huang, S., Ghabrial, S.A. (1996). Organization and expression of the double-stranded RNA genome of *Helminthosporium victoriae* 190S virus, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 12541-12546.

-Icho, T., Wickner, R.B. (1989). The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *Journal of Biological Chemistry* 264: 6716-6723.

-Iyer, L.M., Koonin, E.V., Aravind, L. (2003). Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BMC Structural Biology*, 3:1. doi: 10.1186/1472-6807-3-1.

-Jablonski, S.A., M. Luo, Morrow, C.D. (1991). Enzymatic activity of poliovirus RNA polymerase mutants with single amino acid changes in the conserved YGDD amino acid motif. *Journal Virology* 65: 4565-4572.

-Jacks, M.D., Power F.R., Masiarz P.A., Luciw, P., Barr, J., Varmus, H.E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331: 280-283.

-Jones, D.T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology* 292: 195-202.

- Kamer, G., Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research* 12: 7269-7282.
- Koh, I.Y.Y., Eyrich, V.A., Marti-Renom, M.A., Przybylski, D., Madhusudhan, M.S., Narayanan, E., Graña, O., Valencia, A., Sali, A., Rost, B. (2003). EVA: evaluation of protein structure prediction servers. *Nucleic Acids Research*, 31: 3311-3315.
- Koonin, E.V., Dolja, V.V. (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: Implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28: 375-430.
- Koonin, E.V., Choi, G.H., Nuss, D.L., Shapira, R., Carrington, J.C. (1991). Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double-stranded RNA and a group of positive-strand RNA plant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 10647-10651.
- Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E., Chumakov, K.M. (1989). Tentative identification of RNA-dependent RNA polymerases of RNAbc viruses and their relationship to positive strand RNA viral polymerases. *FEBS Letters*, 252: (1-2), 42-46.
- Lawton, J.A., Estes, M.K., Prasad, B.V. (2000). Mechanism of genome transcription in segmented RNAbc viruses. *Advanced Virus Research* 55: 185-229.
- Lázaro, E. (2006). Virus RNA: viejos patógenos para nuevas enfermedades. *Encuentros en la biología*. Año XIV, 110, 5-7.
- Mason, P.W., Bezborodova, S.V., Henry T.M. (2002). Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*. 76: 9686-9694.
- Mertens, P. (2004). The RNAbc viruses. *Virus Research* 101: 3-13.

- Morris, T.J. (1983). Virus-specific double-stranded RNA: functional role in RNA virus infection. In *Plant Infectious Agents: Viruses, Viroids, Virusoids, and Satellites*, pp. 80-83. Edited by H. D. Robertson, S. H. Howell, M. Zaitlin, Malmerg R. L. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Naitow, H., Tang J, Canady, M., Wickner, R.B., Johnson, J.E. (2002). LA virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism. *Nature Structural Biology* 9: 725-728.
- O'Reilly, E.K., Kao, C.C. (1998). Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* 252: 287-303.
- Paul, C.P., Barry, J.K., Dinesh-Kumar, S.P., Brault, V., Miller, W.A. (2001). A sequence required for -1 ribosomal frameshifting located four kilobases downstream of the frameshift site. *Journal of Molecular Biology* 310: 987-999.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal* 8: 3867-3874.
- Poulos, B.T., Tang, K.F., Pantoja, C.R., Bonami, J.R., Lightner, D.V. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology* 87: 987-996.
- Preisig, O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (1998). Coinfection of a fungal pathogen by two distinct double-stranded RNA viruses. *Virology* 252: 399-406.
- Ribas, J.C., Wickner, R.B. (1992). RNA-dependent RNA polymerase consensus sequence of the L-A double-stranded RNA virus: definition of essential domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 2185-2189.
- Robles, J. (1994). "p-GEM-T vector systems trouble shooting guide." Promega notes 45. 19: 19.

- Rossmann, M.G., Johnson, J.E. (1989). Icosahedral RNA virus structure. *Annual Review of Biochemistry* 58: 533-573.
- Rost, B., Valencia, A. (1996). Pitfalls of protein sequence analysis. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 457-461.
- Rost, B. (2001). Protein secondary structure prediction continues to rise. *Journal Structure of Biology* 134: 204-218.
- Sankar, S., Porter, A.G. (1992). Point mutations which drastically affect the polymerization activity of encephalomyocarditis virus RNA-dependent RNA polymerase correspond to the active site of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *The Journal of Biological Chemistry*. 267: 10168-10176.
- Sasaki, J., Taniguchi, K. (2003). The 5' end sequence of the genome of Aichi virus, a picornavirus, contains an element critical for viral RNA encapsidation. *Journal of Virology* 77: 3542-3548.
- Siegel, R.W., Bellon, L., Beigelman, L., Kao, C.C. (1999). Analysis of template requirements revealed that viral RNA-dependent RNA polymerase could bridge the transition from the RNA to the DNA world. *Journal of Virology* 73: 6424-6429.
- Sit, T.L., Leclerc, D., AbouHaidar, M.G. (1994). The minimal 5' sequence for in vitro initiation of papaya mosaic potexvirus assembly. *Virology* 199: 238-242.
- Sriskanda, V.S., Pruss, G., Ge, X., Vance, V.B. (1996). An eight nucleotide sequence in the potato virus X 3'-UTR is required for both host protein binding and viral multiplication. *Journal of Virology* 70: 5266-5271.
- Steffen, P., Voss, B., Rehmsmeier, M., Reeder, J., Giegerich, R. (2006). RNAshapes: An integrated RNA analysis package based on abstract shapes. *Bioinformatics* 22: 500-503.
- Steitz, T.A. (1993). DNA- and RNA-dependent DNA polymerases. *Current Opinion in Structural Biology* 3: 31-38.

- Vagner, S., Galy, B., Pyronnet, S. (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Reports*. 2: 893-898.
- Van Marle, G., Dobbe, J.C., Gultyaev, A.P., Luytjes, W., Spaan, W.J., Snijder, E.J. (1999). Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 12056-12061.
- Wang, A.L., H.M. Yang, K.A. Shen, Wang, C.C. (1993). Giardiavirus double-stranded RNA genome encodes a capsid polypeptide and a gagpol-like fusion protein by a translation frameshift. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 8595-8599.
- Wickner, R.B., Ribas, J.C., Searfoss, A. (2002). "The double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*" En *RNA Genetic Elements: Concepts and Applications in Agriculture, Forestry and Medicine*. pp 67-108. Tavantzis, S. M. (Ed.), CRC Press LLC. Boca Raton, FL. USA.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3406-3415.
- Zuker, M., Mathews, D.H., Turner, D.H. (1999). *Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide*. NATO ASI Series, Kluwer, Dordrecht.

Apéndice I

Miembros de la familia *Totiviridae*.

GÉNERO	VIRUS	ABREVIATURA	NUMERO DE ACCESO
<i>Totivirus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae L-A Virus</i>	ScV-L-A	JO4692
	<i>Saccharomyces cerevisiae L-1 Virus</i>	ScVL1	X13426
	<i>Saccharomyces cerevisiae La Virus</i>	ScV-L-a	U01060
	<i>Saccharomyces cerevisiae L-BC Virus</i>	ScV-L-BC	U01060
	<i>Ustilago maydis H1 Virus</i>	Umv-H1	V01059
	<i>Ustilago maydis Virus (toxina)</i>	UmV	L76358
	<i>Ustilago maydis 1 Virus (toxina)</i>	UmV 1	M63149
	<i>Zygosaccharomyces bailii Virus</i>	ZbV	AF224490
	<i>Ophiostoma minus Virus</i>	OmV	CAJ34336
	<i>Ustilago maydis P4 Virus(toxina)</i>	UmV-P4	L12226
	<i>Ustilago maydis P6 Virus (toxina)</i>	UmV-P6	M27418
<i>Victorivirus</i>	<i>Helicobasidium mompa N10 Virus</i>	HmTV	AB253329
	<i>Helicobasidium mompa V169 Virus</i>	HmTV	AB253401
	<i>Helicobasidium mompa V670 L2 Virus</i>	HmTV	AB275288;
	<i>Gremeniella abietina L2 Virus</i>	GaRV-L2	YP_044807
	<i>Magnaporthe oryzae 2 Virus</i>	MoV2	AB300379
	<i>Chalara elegans RNA 1 Virus</i>	CeRV1	AY561500
	<i>Sphaeropsis sapinea RNA 1 Virus</i>	SsRV1	AF038665
	<i>Sphaeropsis sapinea RNA2 Virus</i>	SsRV2	AF039080
	<i>Helicobasidium mompa Virus</i>	HmTV1-17	AF039080
	<i>Botryotinia fuckeliana 1 Virus</i>	BfTV1	NC_009224
	<i>Gremeniella abietina L1 Virus</i>	GaRV-L1	AF337175
	<i>Coniothyrium minitans Virus</i>	CmRV	af527633
	<i>Helminthosporium victorie 1905 Virus</i>	Hv190SV	U41345
	<i>Epichloe festucae 1 Virus</i>	EfV-1	AM261427
	<i>Giardia Lambia Virus</i>	GLV	L13218
<i>Giardiavirus</i>	<i>Giardia Lambia Variante china Virus</i>	GLV-C	AF525216
	<i>Tricomonas vaginalis Virus</i>	TVV	U08999
	<i>Tricomonas vaginalis II Virus</i>	TVVII	AF127178
	<i>Tricomonas vaginalis 3 Virus</i>	TVV3	AF325840
	<i>Leishmania RNA 1-1 Virus</i>	LRV1-1	M92355
<i>Leishmanivirus</i>	<i>Leishmania RNA v 1-4 Virus</i>	LRV1-4	U01899
	<i>Leishmania RNA 2-1 Virus</i>	LRV2-1	U32108
	<i>Leishmania RNA 1-10 Virus</i>	LRV1-10	af230885
	<i>Leishmania RNA 1-11</i>	LRV1-11	af230886
	<i>Leishmania RNA 1-13</i>	LRV1-13	139069
	<i>Leishmania RNA no identificado</i>	-	70697
	<i>Leishmania RNA 1-2 Virus</i>	LRV1-2	af230881
	<i>Leishmania RNA 1-7 Virus</i>	LRV 1-7	af230882
	<i>Leishmania RNA 1-8 Virus</i>	LRV1-8	af230883
	<i>Leishmania RNA1-9 Virus</i>	LRV-9	af230884

Apéndice II: Evaluación del proceso de síntesis de cDNA

I. Introducción

¿Por qué es difícil el proceso de obtención de cDNA?

El proceso de síntesis de cDNA a partir de RNAbc de EfV1 fue eficiente en aproximadamente la mitad de los casos en los que se intentó. Incluso una vez encontrado el protocolo adecuado de purificación y desnaturalización de RNAbc, no siempre se obtenían los mismos resultados en la obtención de cDNA, lo que dificultó la obtención final de la secuencia de este virus. Todo esto propició que se incluya este pequeño capítulo, que a simple vista puede no parecer importante, pero sin ninguna duda tiene mucha transcendencia en la obtención de la secuencia completa de cDNA de EfV1.

A pesar de la amplia distribución de los RNAbc dentro de diversos géneros de hongos (Ghabrial, 1998; Batten et al., 2000) son pocos los que han sido caracterizados a nivel molecular. Uno de los mayores problemas está asociado con el clonaje de dsRNA, en su desnaturalización y en la posterior síntesis de cDNA. La dificultad de la obtención de cDNA radica en la naturaleza del RNA de doble cadena y su elevada estabilidad como forma bicatenaria a elevadas temperaturas, que impedían obtener un molde propicio a partir del cual llevar a cabo la síntesis del cDNA. Por lo tanto se procedió a una optimización del proceso de purificación y desnaturalización del RNAbc con la finalidad de reducir las posibilidades de degradación e inhibidores de la transcriptasa reversa, así como evitar la presencia de RNA ribosómico del hongo y obtener un RNAbc puro de alta calidad.

De esta forma toda la información obtenida de los intentos infructuosos, puede dilucidar el camino a seguir en la obtención de futuros cDNA de RNAbc similares a EfV-1.

II. Materiales y métodos

En el proceso general seguido en la obtención de la colección de cDNA de EfV1 se realizaron diversos cambios a lo largo de todo el procedimiento; estos cambios se centran en 4 puntos clave del proceso que se describe en el capítulo anterior y que se muestra en la siguiente figura con las modificaciones realizadas sobre las que hablaremos a continuación.

Figura 34. Proceso general de obtención de la genoteca de cDNAs que dan lugar a EfV1. Son marcados 4 puntos críticos en los que se realizaron modificaciones hasta encontrar el procedimiento adecuado.

- **Punto Crítico 1**

El primero de los puntos críticos es la purificación, en el cual, después de haber realizado una extracción en columna cromatográfica CF11 (Morris y Dodds, 1979), se lleva a cabo una purificación que permitió eliminar los restos de ácidos nucleicos del hongo que podían hacer interferencia en la posterior síntesis de cDNA. La purificación es llevada a cabo de tres formas diferentes:

- A. Purificación de RNAbc por medio de electroforesis en gel de agarosa, con posterior corte de banda y diálisis (Sambrook et al., 2000).
- B. Limpieza y filtración con cartuchos de limpieza de DNA (Qiagen) y por medio de columnas del kit RNaid (Invitrogen).
- C. Limpieza de RNAbc con DNAsa y precipitación con LiCl 5M. La naturaleza del RNAbc permite realizar tratamientos con RNAsa bajo condiciones de alta concentración de sal, esta propiedad permite eliminar restos de RNA celular. (Morris and Dodds, 1979).

La calidad del RNAbc obtenida después de la purificación ha de ser muy buena para evitar posibles interferencias en la síntesis de cDNA, porque según veremos mas adelante no es necesario una gran cantidad de RNAbc siempre y cuando sea de buena calidad.

- **Punto Crítico 2**

El paso dos corresponde al punto en el que se realiza la desnaturalización del RNAbc, y que es uno de los puntos críticos por excelencia. La desnaturalización, que a priori es un paso sencillo en el caso de tratarse de DNA, para el dsRNA es más complicada la obtención de una sola hebra de RNA que

será el molde para realizar la síntesis de cDNA. Hemos visto que la naturaleza estable del RNAbc supuso una ventaja en la purificación, pero en esta ocasión se convierte en un inconveniente.

Para la desnaturalización se emplearon varios métodos:

- I. Desnaturalización por calor a diferentes temperaturas (90 y 95°C con tiempos comprendidos entre 10-15 min.).
- II. Desnaturalización con calor y enfriamiento en nitrógeno líquido (uso de las mismas temperaturas y tiempos que empleando únicamente calor).
- III. Empleo de agentes desnaturalizantes:

- a. Hidroximetilmercurio.

Se mezclan unos 2 ó 3 µg de RNAbc disuelto en H₂O tratada con DEPC con 1 µg de oligos al azar, junto con 1 µl de hidroximetilmercurio 50mM en un volumen final de 11 µl. Se mantiene la mezcla 15 min. a temperatura ambiente después del cual se añaden 62 µl de β-Mercaptoetanol 1.4 M y se pasa a 4°C.

- b. DMSO (Dimetil sulfoxido).

Se parte de una cantidad similar al caso anterior de RNAbc purificado, al que se le va a añadir 1 µg de oligos al azar y un volumen de DMSO hasta obtener una concentración final del 20%. Se calienta esta mezcla a 70°C durante 10 min, enfriándose después en nitrógeno líquido y 3 min, en hielo para lo que ya estaría listo para la síntesis de la primera cadena.

Con todos estos métodos se procedió a realizar una prueba para evaluar la cantidad que se pierde con cada uno de los métodos durante el proceso de desnaturalización, seleccionando finalmente el método que permita partir de la mayor cantidad de RNA desnaturalizado para la síntesis de cDNA.

Si buscamos una referencia en las extracciones de otros miembros de la familia Totiviridae, vemos que los métodos empleados son la desnaturalización con calor en unos y como alternativa el uso del agente desnaturalizante DMSO y Hg en otros. Todo esto se tendrá en cuenta a la hora de decantarse por el método adecuado.

Adicionalmente y previo al proceso de desnaturalización se opta por añadir los oligonucleótidos al azar en una proporción 1:2 frente a la cantidad de RNAbc, de forma parecida al caso de *Conyothyrium minitans* (Cheng et al., 2003), lo que contribuye a la eficiencia del proceso de síntesis de cDNA.

- **Punto Crítico 3**

En el proceso de clonación, y antes de ser ligado el fragmento de cDNA al vector P-Gem-T, se realiza una selección de los fragmentos de mayor tamaño (>300pb) empleando dos alternativas con cada una de las tentativas:

- Columnas de Sephacryl
- Columnas de selección de tamaño de Invitrogen.

- **Punto Crítico 4**

En este punto se realiza una verificación para ver si el cDNA obtenido procede del dsRNA purificado originalmente, para comprobarlo se realiza una hibridación Northern para lo que previamente se elabora un molde de RNAbc obtenido a partir de un clon. Para ello se desnaturaliza el RNAbc y se separa por electroforesis en un gel de agarosa con 1xMOPS al 2% y formaldehído al 37%, para ser transferido a una membrana de nylon Hybond-N+: La membrana fue hibridada con una sonda elaborada a partir de uno de los primeros clones obtenidos de cDNA (X1-13) (figura 35), y cuyo marcaje se realiza con

fluoresceína. De manera complementaria se realiza un dot-plot. Este punto es crítico debido a que la ausencia de hibridación de una sonda (elaborada a partir de clones obtenidos) puede ser debida a dos cosas, una a que realmente el clon de cDNA no proviene del RNAbc de EfV1 o bien por que existe algún contaminante que interfiere en el proceso.

Una vez obtenida una identificación positiva del cDNA de clones, se selecciona una mezcla procedente de todos ellos, para ser empleada como sonda, y después es marcada con fluoresceína, (los clones empleados son, X143, X121, X124, X128, X120, X130 y X231). De esta forma en las sucesivas clonaciones se elaboran filtros en los que se realiza una fijación de colonias (Saambrook et al., 2000) para seleccionar todas aquellas que pueden contener un inserto perteneciente a EfV1.

Figura 35. 1) hibridación con la sonda X1-13 de la banda correspondiente al genoma de EfV-1. 2) Dot blot realizado con la sonda x1-13 marcada.

- **Punto Crítico 5**

Finalmente este punto, referido a la síntesis de los extremos 3' y 5', surgen problemas en la obtención del extremo 5', realizándose todas las posibles variaciones indicadas en los anteriores 3 puntos; ante la ausencia de un resultado válido, se optó por un nuevo procedimiento. Para conseguir el extremo 5' definitivo fue empleado como material de partida RNA total en lugar de emplear

el RNAbc extraído con cromatografía en CF11. La extracción de RNA se realiza con Tri-Reagent para lo que se realizan los siguientes pasos:

- **Homogenización** de 100mg de muestra a la que se le añade 1ml de Tri-reagent.
- **Separación:** con la adición de 0.2 ml de cloroforma por cada ml de Tri-reagent es llevada a cabo la separación de la fase acusa en la que está todo el RNA.
- **Precipitación:** es llevada a cabo con isopropanol, en proporción 0.5 ml por cada uno de Tri-reagent.
- **Lavados de RNA:** los lavados se realizan con etanol al 75%.
- **Solubilización del RNA:** que se realiza en H₂O tratada con DEPC.

Para su posterior uso en la síntesis de cDNA por RT-PCR (en este caso para realizar RACE 5'), es necesario el tratamiento con DNAsaI.

Después el producto PCR del RACE 5' obtenido es ligado al vector P-GemT (según se describe en el capítulo anterior), y después de ser transformado dará lugar a multitud de colonias de las que será obtenido el extremo 5' de EfV1 que por ahora consideraremos como definitivo.

III. Resultados y discusión

El proceso de obtención de genoma vírico es complejo, pero además puede verse dificultado si durante cualquiera de los pasos mencionados (como son la obtención de cDNA, la unión de una adenosina, la selección del tamaño de los cDNAs, e incluso del ligado al vector, así como de si realmente hemos obtenido cDNA procedente del RNAds) existe la imposibilidad de realizar un seguimiento del resultado de cada uno de ellos para comprobar si se realizan satisfactoriamente todos los pasos. Todo ello sumado a la multitud de opciones empleadas en la puesta a punto del protocolo de obtención, junto con el problema

que supone el trabajo con RNAbc, hizo demorar mucho en el tiempo la consecución del genoma de EfV1.

Si comentamos el proceso punto a punto, en el primero de ellos (la purificación) hemos de decir que de los métodos empleados descartamos el corte de banda ser un proceso que conlleva muchas contaminaciones en su manipulación. Se da por válido cualquiera de los otros dos métodos planteados, ya que ambos ofrecen un buen resultado de cara a obtener un RNAbc de buena calidad.

En el punto dos, la comparativa de los distintos métodos desnaturalizantes ofreció los siguientes resultados:

El efecto de desnaturalización por alta temperatura parece que se puede mantener empleando el uso adicional de nitrógeno líquido, que permite mantenerlo desnaturalizado el tiempo suficiente como para iniciar la síntesis de la primera cadena de cDNA de una manera eficiente. Esta conclusión se deriva de los resultados prácticos y no de la prueba de eficiencia realizada en el que precisamente el empleo de calor y nitrógeno resultaba ser el método en el que mas RNA se perdía (ver figura 36). El empleo de los agentes desnaturalizantes como alternativa parecen algo menos eficientes, pero la inocuidad de usar únicamente calor y nitrógeno líquido hace a éste método el más adecuado para esta fase.

Figura 36. Comparativa de los distintos métodos empleados en la desnaturalización de RNAbc. Electroforésis realizada en gel de agarosa al 20%. En todos los carriles son cargadas las mismas cantidades de RNAbc previamente desnaturalizado de distintas maneras. En el carril 1 la desnaturalización es realizada por calor a 95°C, en el carril 2 a la desnaturalización con calor es adicionado el enfriamiento en nitrógeno líquido; carril 3 desnaturalización con hidroximetilmercurio, carril 4 desnaturalización con DMSO, y en el carril 5 marcador λ Hind-III.

En el punto 3, la selección de fragmentos mayores de 300pb resulta ser igual de eficiente empleando los dos métodos mencionados, en éste caso se opta por aquel cuyo proceso es más sencillo, para evitar más manipulaciones de las necesarias, en éste caso son las columnas de Sephacril.

Respecto al punto 4, la verificación con hibridación Northern es fiable siempre y cuando se disponga de una sonda fiable, y se realicen controles en cada proceso de hibridación. Éste método resulto útil y rápido, así como mas inocuo que el empleo de radioactividad, cuando se dispone de una sonda que se sabe que es válida. El empleo de este tipo de hibridación puede tener una aplicación muy útil, y es que permita identificar posibles virus de RNAbc y pertenecientes incluso a esta familia, si se emplea una sonda de una región conservada específica de esta familia.

Finalmente el punto 5, que sugiere una forma alternativa de obtención de RNAbc, es adecuado y rápido en el caso de disponer de oligonucleótidos conocidos, sobre todo en caso de extremos conocidos. Pero se descarta su uso en el inicio de la obtención de secuencias, ya que una extracción de RNAtotal

conlleva mayor contaminación y más incertidumbre a la hora de obtener un fragmento vírico de esta naturaleza.

IV. Bibliografía

- Batten, J.S., Scholthof, K.-B. G., Miller, M. E., Martyn, R. D. (2000). cDNA probes for detection of specific dsRNAs from the fungal pathogen, *Monosporascus cannonballus*. *Journal of Virological Methods*, vol 84; 2: 209-215
- Cheng, J., Jiang, D.-H., Fu, Y., Li, G., Peng, Y., Ghabrial, S.A. (2003). Molecular characterization of a dsRNA totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. *Virus Research* 93, 41-50.
- Ghabrial, S. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes* 16: 119-131.
- Morris, T.J., Dodds, J.A. (1979). Isolation and analysis of double-strand RNA virus-infected plant and fungal tissues. *Phytopathology*, vol 69, 8: 854-858.
- Sambrook, J., Russell, D., Russell, D.W. (2000). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual: Set of Volumes 1, 2, and 3, Third Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Apéndice III

- Codones empleados en la traducción de cada aminoácido de ORF1

Ala(A)	gca	18	Glu(E)	gaa	8	Lys(K)	Total	14	Thr(T)	acg	13
	gcc	37		gag	23	Met(M)	aug	12		acu	10
	gcg	20		Total	31		Total	12		Total	54
	gcu	30	Gly(G)	gga	7	Phe(F)	uuc	20	Trp(W)	ugg	7
	Total	105		ggc	22		Uuu	3		Total	7
Arg(R)	aga	2		ggg	21		Total	23	Tyr(Y)	uac	13
	agg	3		ggu	21	Pro(P)	cca	13		uau	5
	cga	4		Total	71		ccc	31		Total	18
	cgc	18	His(H)	cac	15		ccg	13	Val(V)	gua	6
	cgg	9		cau	6		ccu	15		guc	25
	cgu	12		Total	21		Total	72		gug	12
	Total	48	Ile(I)	aua	3	Ser(S)	agc	12		guu	11
Asn(N)	aac	13		auc	18		agu	5		Total	54
	aau	5		auu	4		uca	5	Total 766		
	Total	18		Total	25		ucc	14			
Asp(D)	gac	20	Leu(L)	cua	5		ucg	12			
	gau	18		cuc	24		ucu	10			
	Total	38		cug	10		Total	58			
Cys(C)	ugc	3		cuu	8	Ter(.)	uaa	0			
	ugu	7		uua	6		uag	0			
	Total	10		uug	5		uga	1			
Gln(Q)	caa	6		Total	58		Total	1			
	cag	21	Lys(K)	aaa	5	Thr(T)	aca	10			
	Total	27		aag	9		acc	21			

- **Hidrofobicidad en la secuencia de aminoácidos del ORF1**

La secuencia de aminoácidos de una proteína contiene información de la estructura secundaria y terciaria, así como de la accesibilidad de los aminoácidos al solvente (hidrofobicidad). Por tanto con secuencia primaria se pueden generar representaciones de como varía la hidrofobicidad a lo largo de la secuencia de la proteína para tener información que ayudará a conocer la disposición de determinados residuos en la predicción. Así Kyte y Doolittle propusieron el siguiente procedimiento: 1) seleccionar una escala de hidrofobicidad que describa la tendencia de los aminoácidos a residir en un medio hidrofóbico o polar; 2) realizar un gráfico con los valores de hidrofobicidad de cada aminoácido y la secuencia de aminoácidos en concreto y 3) matizar los valores indicados en la gráfica por medio de un promedio de las tendencias, empleando para ello ventanas deslizantes de diferentes tamaños. Con esta gráfica de hidrofobicidad o hidropatía se pueden predecir las regiones de una proteína que se encuentran expuestas al medio (ventana de 7 residuos, baja hidropatía).

Utilizando el método de Kyte y Doolittle y se incrementa el nivel de predicción de las estructuras que forman la proteína, y además se añade información acerca de su posible conformación.

Figura 37. A) Representación de perfiles de hidrofobicidad realizados con los correspondientes índices de hidrofobicidad de cada aminoácido, dependiendo estos índices del grado de hidrofobicidad que tenga su cadena lateral. Los índices fueron propuestos por Jack Kyte y Russell Doolittle en 1982. B) representación de la flexibilidad de una proteína según los datos aportados por cada uno de los aminoácidos.

A **B**

Tabla 1. Escala de hidrofobicidad para cada uno de los aminoácidos según la escala de *Kyte-Doolittle*, los valores por encima de 0 son hidrofóbicos en carácter.

Ala	1.800	Glu	-3.500	Met	1.900	Tyr	-1.300
Arg	-4.500	Gly	-0.400	Phe	2.800	Val	4.200
Asn	-3.500	His	-3.200	Pro	-1.600	Asx	-3.500
Asp	-3.500	Ile	4.500	Ser	-0.800	Glx	-3.500
Cys	2.500	Leu	3.800	Thr	-0.700	Xaa	-0.490
Gln	-3.500	Lys	-3.900	Trp	-0.900		

- -Codones empleados en la traducción de cada aminoácido para el ORF2

Ala(A)	gca	18	Glu(E)	gaa	16	Lys(K)	Total	23	Thr(T)	acg	7
	gcc	31		gag	25	Met(M)	aug	17		acu	6
	gcg	26		Total	41		Total	17		Total	50
	gcu	25	Gly(G)	gga	10	Phe(F)	uuc	14	Trp(W)	ugg	14
	Total	100		ggc	27		Uuu	2		Total	14
Arg(R)	aga	1		ggg	13		Total	16	Tyr(Y)	uac	25
	agg	6		ggu	12	Pro(P)	cca	5		uau	12
	cga	10		Total	62		ccc	17		Total	37
	cgc	22	His(H)	cac	13		ccg	7	Val(V)	gua	8
	cgg	14		cau	6		ccu	12		guc	27
	cgu	11		Total	19		Total	41		gug	18
	Total	64	Ile(I)	aua	5	Ser(S)	agc	7		guu	17
Asn(N)	aac	22		auc	9		agu	6		Total	70
	aau	8		auu	3		uca	10	Total 828		
	Total	30		Total	17		ucc	15			
Asp(D)	gac	27	Leu(L)	cua	11		ucg	17			
	gau	12		cuc	37		ucu	8			
	Total	39		cug	17		Total	63			
Cys(C)	ugc	5		cuu	14	Ter(.)	uua	0			
	ugu	6		uua	6		uag	0			
	Total	11		uug	10		uga	1			
Gln(Q)	caa	9		Total	95		Total	1			
	cag	9	Lys(K)	aaa	10	Thr(T)	aca	18			
	Total	18		aag	13		acc	19			

- **Hidrofobicidad en la secuencia de aminoácidos del ORF2**

Al igual que en el caso anterior, con la secuencia primaria se generan representaciones de la variación de la hidrofobicidad a lo largo de la secuencia de la proteína obteniéndose así información para predecir las posiciones de los aminoácidos dentro de la estructura secundaria definitiva que tenga la proteína. La escala de hidrofobicidad para cada uno de los aminoácidos según la escala de *Kyte-Doolittle* está referenciada en el estudio anterior de ORF1.

Figura 38. A: Representación de perfiles de hidrofobicidad realizados con los correspondientes índices de hidrofobicidad de cada aminoácido, dependiendo estos índices del grado de hidrofobicidad que tenga su cadena lateral. B representación de la flexibilidad de una proteína según los datos aportados por cada uno de los aminoácidos.

A **B**

- cDNAs similares a EfV-1

Tabla 37: Lista de secuencias similares a la secuencia completa de cDNA de EfV-1 en la que aparec en la mayoría de miembros de la familia *Totiviridae*.

E)	solapamiento	%similaridad	%igualdad	Longitud	Especie	ID
9.5e-15	839	55.066	55.066	5358	<i>Eimeria brunetti</i> RNA virus 1.	AF356189
6.00e-20	990	53.131	53.131	1520	<i>Thielaviopsis basicola</i> RNAbc	AY556454
3.7e-22	852	51.526	51.526	2336	<i>Thielaviopsis basicola</i> RNAbc	AY556461
1.9e-24	886	52.709	52.709	5179	<i>Helminthosporium victorae</i> virus	U41345
4.1e-25	1016	53.937	53.937	5310	<i>Thielaviopsis basicola</i> RNAbc	AY561500
5.4e-26	553	56.962	56.962	5261	<i>Botryotinia fuckeliana</i> totivirus	AM491608
1.7e-28	706	55.241	55.241	1314	<i>Ophiostoma minus</i> totivirus pa	AM111098
5.5e-29	769	55.657	55.657	5207	<i>Helicobasidium mompa</i> Na.17 ds	AB085814
5.7e-38	1503	53.626	53.626	5163	<i>Sphaeropsis sapinea</i> RNA virus	AF038665
1.6e-46	1286	55.132	55.132	5359	<i>Magnaporthe oryzae</i> virus 1 ge	AB176964
6.3e-179	2227	59.362	59.362	5129	<i>Gremmeniella abietina</i> RNA vir	AY615210
5.00e-185	2213	60.145	60.145	2389	<i>Conithyrium minitans</i> mycovir	AF521012
4.7e-185	2213	60.145	60.145	4975	<i>Conithyrium minitans</i> mycovir	AF527633
5.3e-189	2313	59.576	59.533	5133	<i>Gremmeniella abietina</i> RNA vir	AF337175
3.00e-216	2325	62.022	61.978	5202	<i>Sphaeropsis sapinea</i> RNA virus	AF039080

100

240	240
239	239
238	238
241	241
234	234
205	205
234	234
234	234
243	243
233	233
265	265
266	266
266	266
735	735
212	212
197	197
207	207
218	218
221	221
330	330
330	330
329	329
330	330
321	321
395	395
324	324
321	321
329	329
336	336
336	336
326	326
374	374
375	375
349	349
385	385
374	374
293	293
299	299
302	302

190 APÉNDICE iv

APÉNDICE iv 191

[illegible]

GabietinaL2	-----	776
GabietinaRNAvirusL1	-----	776
Cminitansmycovirus	-----	775
SsapinearNAvirus2	-----	789
Efv-1	-----	765
HmV-17	-----	788
SsapinearNAvirus1	-----	833
Hvictoriaevirus190S	-----	772
TbasicoladsRNAvirus1	-----	770
MgV	-----	746
LeishmaniaRNAvirus1-1	-----	741
LeishmaniaRNAvirus1-4	-----	742
LeishmaniaRNAvirus2-1	-----	714
Giardialambliavirus	-----	886
Giardiacanisvirus	-----	887
EbrunettiRNAvirus1	-----	770
UstilagomaydisvirusH1_completo	ETLSGSQGTEDARKLIADTATLTDNITSVRVGDVLR	1820
ScerevisiaevirusL-A	-----	680
ScerevisiaevirusL-BC_La	-----	697
Tricomonasvaginalisvirus	-----	678
TricomonasvaginalisvirusII	-----	709
Tricomonasvaginalisvirus3	-----	708
ruler	1810.....1820.....1830.....	

II. Alineamientos realizados con el programa ClustalX con las secuencias pertenecientes a la polimerasa completa. de los miembros de la familia *Totiviridae*

CLUSTAL X (1.81) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: F:secuencias arbolespolimerasaprot completaSecuencias de virus de RNAbc POIDMEFAB.Seq 21 18:41:48 2006
Page 1 of 7

```

Helminthosporium
Sphaeropsis sapinea RNA virus1
Sphaeropsis sapinea RNA virus2
Oncementella
Coniothyrium
Leishmania RNA virus1-1
Leishmania RNA virus1-4
Leishmania RNA virus2-1
T. vaginalis virusII
T. vaginalis virus3
Giardia lamblia virus fusion
Giardia lamblia virus
Emmerhizella virus
T. vaginalis virus
S. cerevisiae virus L-A
S. cerevisiae virus J-NC
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150
52
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

```

APÉNDICE iv 195

Helminthosporium	11	GGTGGGCTGGG	12	GGTGGGCTGGG
T basicola	13	GGTGGGCTGGG	14	GGTGGGCTGGG
Sphaeropsis sapinea RNA virus1	15	GGTGGGCTGGG	16	GGTGGGCTGGG
Sphaeropsis sapinea RNA virus2	17	GGTGGGCTGGG	18	GGTGGGCTGGG
Gremmeniella	19	GGTGGGCTGGG	20	GGTGGGCTGGG
Coniothyrium	21	GGTGGGCTGGG	22	GGTGGGCTGGG
Leishmania RNA virus1-1	23	GGTGGGCTGGG	24	GGTGGGCTGGG
Leishmania RNA virus1-2	25	GGTGGGCTGGG	26	GGTGGGCTGGG
Leishmania RNA virus2-1	27	GGTGGGCTGGG	28	GGTGGGCTGGG
T vaginalis virus3	29	GGTGGGCTGGG	30	GGTGGGCTGGG
Giardia lamblia virus fusion	31	GGTGGGCTGGG	32	GGTGGGCTGGG
Giardia canis virus	33	GGTGGGCTGGG	34	GGTGGGCTGGG
Emeriaharattinavirus1	35	GGTGGGCTGGG	36	GGTGGGCTGGG
T vaginalis virus	37	GGTGGGCTGGG	38	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1	39	GGTGGGCTGGG	40	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1a	41	GGTGGGCTGGG	42	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1b	43	GGTGGGCTGGG	44	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1c	45	GGTGGGCTGGG	46	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1d	47	GGTGGGCTGGG	48	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1e	49	GGTGGGCTGGG	50	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1f	51	GGTGGGCTGGG	52	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1g	53	GGTGGGCTGGG	54	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1h	55	GGTGGGCTGGG	56	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1i	57	GGTGGGCTGGG	58	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1j	59	GGTGGGCTGGG	60	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1k	61	GGTGGGCTGGG	62	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1l	63	GGTGGGCTGGG	64	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1m	65	GGTGGGCTGGG	66	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1n	67	GGTGGGCTGGG	68	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1o	69	GGTGGGCTGGG	70	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1p	71	GGTGGGCTGGG	72	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1q	73	GGTGGGCTGGG	74	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1r	75	GGTGGGCTGGG	76	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1s	77	GGTGGGCTGGG	78	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1t	79	GGTGGGCTGGG	80	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1u	81	GGTGGGCTGGG	82	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1v	83	GGTGGGCTGGG	84	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1w	85	GGTGGGCTGGG	86	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1x	87	GGTGGGCTGGG	88	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1y	89	GGTGGGCTGGG	90	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1z	91	GGTGGGCTGGG	92	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1aa	93	GGTGGGCTGGG	94	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1ab	95	GGTGGGCTGGG	96	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1ac	97	GGTGGGCTGGG	98	GGTGGGCTGGG
S cerevisiae virus1-EC1ad	99	GGTGGGCTGGG	100	GGTGGGCTGGG

Helminthosporium	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1495	1496	1497	1498	1499	1500	1501	1502	1503	1504	1505	1506	1507	1508	1509	1510	1511	1512	1513	1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1523	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1531	1532	1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540	1541	1542	1543	1544	1545	1546	1547	1548	1549	1550	1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558	1559	1560	1561	1562	1563	1564	1565	1566	1567	1568	1569	1570	1571	1572	1573	1574	1575	1576	1577	1578	1579	1580	1581	1582	1583	1584	1585	1586	1587	1588	15
------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----

Helminthosporium	609	SGAAGDVALEPTLADCATINNTVQCMNPTQSGTGKAEALGINSAG--	610	SGAAGDVALEPTLADCATINNTVQCMNPTQSGTGKAEALGINSAG--	611	SGAAGDVALEPTLADCATINNTVQCMNPTQSGTGKAEALGINSAG--
T basicola	482	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	483	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	484	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
Sphaeropsis sapinea RNA virus1	613	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	614	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	615	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
Sphaeropsis sapinea RNA virus2	597	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	598	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	599	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
Ooemennella	501	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	502	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	503	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
Coniolum	599	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	600	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	601	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
Leishmania RNA virus1-1	643	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	644	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	645	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
Leishmania RNA virus1-4	647	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	648	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	649	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
Leishmania RNA virus2-1	547	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	548	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	549	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
T vaginalis virus1	1253	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1254	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1255	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
T vaginalis virus3	497	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	498	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	499	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
Giardia lamblia virus fusion	1866	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1867	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1868	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
Giardia lamblia virus	1846	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1847	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1848	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
Emmeria tennisi RNA virus	1246	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1247	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1248	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
T vaginalis virus	1335	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1336	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1337	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
S cerevisiae virus L-A	545	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	546	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	547	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
S cerevisiae virus L-BC La	679	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	680	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	681	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
UMVH1	1558	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1559	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1560	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
ruler	1560	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1561	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG	1562	SHVDDVTRADTSCHEIDRVSQCINPAQSVGCTCEPMAATQETNG
Helminthosporium	735	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	736	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	737	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
T basicola	482	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	483	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	484	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
Sphaeropsis sapinea RNA virus1	738	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	739	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	740	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
Sphaeropsis sapinea RNA virus2	727	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	728	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	729	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
Ooemennella	1593	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1594	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1595	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
Coniolum	729	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	730	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	731	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
Leishmania RNA virus1-1	770	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	771	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	772	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
Leishmania RNA virus1-4	774	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	775	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	776	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
Leishmania RNA virus2-1	675	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	676	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	677	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
T vaginalis virus1	1367	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1368	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1369	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
T vaginalis virus3	611	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	612	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	613	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
Giardia lamblia virus fusion	1724	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1725	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1726	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
Giardia lamblia virus	1784	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1785	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1786	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
Emmeria tennisi RNA virus	1357	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1358	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1359	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
T vaginalis virus	667	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	668	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	669	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
S cerevisiae virus L-A	791	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	792	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	793	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
S cerevisiae virus L-BC La	1701	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1702	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1703	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
UMVH1	1800	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1801	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1802	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG
ruler	1800	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1801	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG	1802	SGAATGPELIGASVGLRCRERD--LLEMTG

Helminthosporium	FRVAGCSNAETTCGG-VHEGCLSCMPHLE-E	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
T basicola	TTATACADASDLHEDVGVLEA PLYMVA	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Sphaeropsis sapinea RNA virus1	VRAG---TASVRLNTAPPGCEER PULIA	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Sphaeropsis sapinea RNA virus2	RSIG---TASVRLNTAPPGCEER PULIA	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Grammella	RSIG---TASVRLNTAPPGCEER PULIA	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Coniothyrium	RSIG---TASVRLNTAPPGCEER PULIA	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Leishmania RNA virus1-1	NPICCTITEEATPVA GTS PLIMMA	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Leishmania RNA virus1-4	NPICCTITEEATPVA GTS PLIMMA	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Leishmania RNA virus2-1	NSDGVTPNCDER PVKGA EX PLIMMI	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Leishmania RNA virus2-2	NSDGVTPNCDER PVKGA EX PLIMMI	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
T vaginalis virus1	NPIDVTPNCDER PVKGA EX PLIMMI	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
T vaginalis virus2	NPIDVTPNCDER PVKGA EX PLIMMI	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
T vaginalis virus3	NPIDVTPNCDER PVKGA EX PLIMMI	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Giardia lamblia virus fusion	NCIANEA QLEKKI PENIAP	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Giardia canis virus	QKIGAVID TQSVTIGSEPP DPAIT	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Emmerbrunettirnavirus1	QKIGAVID TQSVTIGSEPP DPAIT	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
S cerevisiae virus L-A	TVPLDIA DAADTTDSQGLAQ PLSIA	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
S cerevisiae virus L-B	TVPLDIA DAADTTDSQGLAQ PLSIA	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Donvi	TVPLDIA DAADTTDSQGLAQ PLSIA	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
ruler	TVPLDIA DAADTTDSQGLAQ PLSIA	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940

I. Alineamientos realizados con el programa ClustalX con las secuencias pertenecientes a los motivos conservados de la polimerasa. de los miembros de la familia *Totiviridae*