



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**Caracterización de los virus asociados a la
enfermedad enrollado de la hoja de la vid
en la Argentina**

Ing. Agr. Sebastián Gómez Talquena

Director: Dr. Oscar Grau
Co-Directora: Ing.Agr. Olga Gracia

Año 2012

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizado en la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza (EEA Mendoza) dependiente del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, bajo la dirección del Dr. Oscar Grau y de la Ing.Agr. Olga Gracia.

*dedicado a la siempre viva memoria de Roberto
Gómez y Elsa de Gómez.*

“..... Con envidia recuerdo a algún famoso novelista, en horas de insomnio, bebía té y escribía dos o tres capítulos de un libro en preparación; pero esa historia es para mí y ¿quién sabe? para algunos de mis lectores, de la mayor importancia. Un comienzo parece tan bueno como otro, propongamos éste:”

El Ídolo, LA TRAMA CELESTE, Adolfo Bioy Casares

“.....

7. All animals are equal, *but some animals are more equal than others.*”

ANIMAL FARM, A FAIRY STORY. George Orwell

Reconocimientos

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, por haberme brindado los medios materiales para realizar el presente trabajo de tesis, a través del Proyecto Nacional AEBIO 1819 “Caracterización de los virus filamentosos que afectan a la vid en Argentina. Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico” y del Proyecto Específico AEPV 214012 “Identificación, producción de reactivos de diagnóstico, caracterización y análisis de la variabilidad de patógenos”.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por permitirme desarrollar mi carrera de doctorado en su ámbito.

Al sistema educativo argentino, por haberme permitido completar todas las etapas de mi formación (inicial, secundaria, universitaria y de posgrado) en entidades educativas públicas, en forma totalmente libre y gratuita.

Agradecimientos

En primer lugar a mis directores: O.G. y O.G.; soy incapaz de poner a uno por delante de otro. Por haberme dado la posibilidad de formarme al lado de ellos, abriéndome la puerta al mundo de la ciencia. Por haberle dado sentido a mi carrera profesional, encontrando una vocación que yo no conocía. Por enseñarme a moverme en un mundo ajeno por completo para mí. Por instruirme en todos los aspectos de mi formación, desde hacer un ELISA hasta elegir con quien relacionarme profesionalmente. Por abrirme las puertas de sus casas. Por todo, y aun más.

A mis amigos (/compañeros) del Laboratorio de Fitovirología de la EEA Mendoza INTA. Nancy, Claudio, Melisa. Por haber colaborado conmigo cada vez que se los pedí. Por haber hecho lo imposible por que las cosas salieran. Por nunca haber dicho NO. Por estar al lado mio todos los días. Por alentarme. Por perseguirme.

A Sandra García Lampasona y Ricardo Masuelli, por abrirme las puertas al mundo de la Biología Molecular, hace más de diez años atrás. Con eso dieron pie para que todo este trabajo (y mi carrera) fuera posible.

A Rubén Oliva, por haberme abierto las puertas de la EEA Mendoza hace ya mucho tiempo. Siempre vas a estar en mi memoria como un mecenas de la ciencia.

A mis amigos del trabajo, Goly, Santiago, Pepe, Pata, Melisa, Claudio. Por permitir que el lugar de trabajo sea un sitio donde las satisfacciones (personales) superen a los malos momentos. Por estar dispuestos a compartir una tarde (incluso hasta que se venga la noche) para hacer catarsis cada vez que hizo falta.

A Diego Lijaveztky, Rubén Bottini, Patricia Piccoli y Luis Conci, y en nombre de ellos a toda la comunidad científica que me rodea en el día a día por el apoyo y la confianza depositada en mi trabajo, y más importante, en mí persona. Al clamor popular porque finalizara mi tesis.

Al Dr. Jose Gudiño, Director de la EEA Mendoza INTA, y al Dr. Carlos Parera, director del CR Mendoza-San Juan INTA, por todo el apoyo institucional brindado. Por permitirme utilizar parte de mi tiempo de trabajo en el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros en el IBBM: Carina, Cecilia, Eduardo, Veronica, Martín. Por haberme acompañado en mi estadía, haberme brindado contención y apoyo, en el día a día del laboratorio, y en las noches de la vida que viví en La Plata. A Silvia, por estar todas las veces que la necesité, y siempre ayudarme a salir del paso.

A la Dra. María Laura García, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme el apoyo técnico necesario.

A Sebastián Besse, por recibirme en el Groupe de Virologie et Bacteriologie, de la Station de Recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, Nyon, Suiza. Por ayudarme a perfeccionar mi trabajo en inmunología. Por proveerme de los antisueros y anticuerpos monoclonales usados en este trabajo. A Natalie Dubois, por seguirme por todo el laboratorio y estar dispuesta a dejar todo de lado por ayudarme.

Al Dr. Pasquale Saldarelli, del Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi, por proveer el antisuero AS-252-IL.

Al Dr. Sead Sabanadzovic, del Department of Biochemistry, Molecular Biology, Entomology and Plant Pathology, Mississippi State University, por proveerme las secuencias de GLRaV-4 y -6 previo a su publicación.

A la Dra. Claudia Nome, del Instituto de Patología Vegetal (IPAVE), Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), INTA, por proveer el material infectado con SPCSV.

Al Dr. Mariano Donato, por sus fructíferas discusiones en los aspectos de filogenia de este trabajo. Su dedicación para ayudarme a exprimir los datos disponibles, me permitió generar árboles que no solo fueran una figura, sino que explican una historia evolutiva concreta. Al Dr. Jorge Crisci, por ponerme en contacto con él. El aporte de ambos permitió mejorar sensiblemente la presentación del capítulo cinco de esta tesis, y madurar las conclusiones del mismo.

A Jorge, Mabel, Gaby y Facundo, por bancarme cada vez que estuve en Buenos Aires. Por hacerme sentir como en casa, como uno más de la familia.

Finalmente (pero no por eso en último lugar), a mi familia. Carina, compañera de mi vida, porque tuviste que bancar mis ausencias, mis caprichos y mis broncas. Por poner el hombro al lado mio. Por permitirme que construya mi carrera profesional a la vez que construimos nuestra familia. A Julieta y a Nicolás, porque sin darse cuenta, le permitieron a Papá estar lejos de ellos en pos de algo que esta muy lejos de su comprensión (hoy día). Por existir, y ser así el incentivo para todo lo que hago en esta vida.

Contenido

Capítulo I: Introducción	1
I.1 EL CULTIVO DE LA VID	2
I.1A Historia de la viticultura	2
I.1B Importancia de la viticultura.....	2
I.1C Sanidad del viñedo argentino	3
I.2 ENFERMEDADES VIRALES DE LA VID.....	3
I.3 ENROLLAMIENTO DE LA HOJA.....	4
I.3A Etiología de LD	6
I.4 TAXONOMÍA DE GRAPEVINE LEAFROLL ASSOCIATED VIRUS EN LA FAMILIA CLOSTEROVIRIDAE	7
I.4A Género <i>Ampelovirus</i>	8
Objetivos	14
Capítulo II: Materiales y Métodos	17
II.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	18
II.1A Aislamientos virales.....	18
II.1B Antisueros policlonales.....	18
II.1C Anticuerpos monoclonales	19
II.1D Cepas bacterianas	19
II.1E Vectores de clonación	20
II.2 SOLUCIONES, BUFFERS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	21
II.2A Purificaciones de dsRNA.....	21
II.2B Purificación de DNA plasmídico	22
II.2C DAS ELISA.....	23
II.2D SDS-PAGE.....	23
II.2E Western Blot.....	24
II.2F Purificación de virus.....	25

II.2G Medios de cultivo para bacterias.....	26
II.3 TÉCNICAS COMUNES A TODOS LOS CAPÍTULOS	27
II.3A Purificación dsRNA(Macro)	27
II.3B Purificación dsRNA(Micro).....	28
II.3C Transcripción inversa (RT)	29
II.3D RT-PCR.....	29
II.3E Colony PCR.....	29
II.3F PCR-RFLP.....	30
II.3G Purificación de DNA plasmídico (lisis alcalina).....	30
II.3H Purificación de DNA plasmídico (método merlín)	31
II.3I DAS-ELISA	32
II.3J Preparación de bacterias competentes	33
Capítulo III: Identificación y secuenciación parcial de un ampelovirus identificado en vid en Argentina	34
III.1 INTRODUCCIÓN	35
III.1A Ocurrencia de los ampelovirus del subgrupo I en el mundo	35
III.1B Ocurrencia de virus asociados a LD en la Argentina	35
III.1C Uso de ORF codificante para HSP70h como región válida para diagnóstico.....	37
III.1D Uso de primers degenerados para amplificación de secuencias distantemente relacionadas	38
III.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
III.2A Material vegetal y asilamientos virales utilizados.	40
III.2B Diseño de primers para Closterovirides.....	41
III.2C Puesta a punto de condiciones de amplificación de primers CODEHOP.....	42
III.2D Secuenciación parcial del genoma de un ampelovirus identificado en la variedad Red Globe	43
III.3 RESULTADOS	46

III.3A	Diseño de un par de primers parcialmente degenerados para la amplificación de la HSP70h de closterovirids	46
III.3B	Secuenciación parcial del genoma de un Ampelovirus identificado en la variedad Red Globe	47
III.4	DISCUSIÓN.....	55
	Capítulo IV: Caracterización serológica de ampelovirus del subgrupo I.....	56
IV.1	INTRODUCCIÓN.....	57
IV.1A	Serología de los ampelovirus del subgrupo I	59
IV.2	MATERIALES Y MÉTODOS	61
IV.2A	Material vegetal.....	61
IV.2B	Purificación de virus	62
IV.2C	SDS PAGE – Western blot.....	63
IV.3	RESULTADOS	64
IV.3A	Western Blot.....	65
IV.4	DISCUSIÓN.....	68
	Capítulo V: Variabilidad genética de la CP de ampelovirus del subgrupo I.....	71
V.1	INTRODUCCIÓN.....	72
V.1A	Estructura genética de ampelovirus del subgrupo I	72
V.1B	Variabilidad genética de la CP de los closterovirides	73
V.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
V.2A	Material vegetal.....	75
V.2B	Diseño de primers para CP de ampelovirus del subgrupo I	77
V.2C	Amplificación, clonación, secuenciación y obtención de secuencia de la CP.....	78
V.2D	Análisis de secuencias.....	79
V.3	RESULTADOS	82

V.3A Amplificación de la CP	82
V.3B Análisis de secuencias	86
V.3C Análisis filogenético	93
V.4 DISCUSIÓN.....	97
Conclusión general	109
Referencias.....	111
Anexos.....	118
ANEXO I. PROGRAMAS DE PCR Y PRIMERS UTILIZADOS	119
1. PROGRAMA CHP	119
2. PROGRAMA SALDARELLI 98	119
3. PROGRAMA P1N6.....	119
4. PROGRAMA LR5-S/A	120
5. PROGRAMA SL-S/C-HSP90.....	120
6. PROGRAMA C-HSP91/C-CP	120
7. PROGRAMA C-HSP91/C-CP	120
8. PROGRAMA GAP5-9.....	121
9. PROGRAMA COLONY PCR	121
ANEXO II. ESCALA DE SEVERIDAD DE SÍNTOMAS UTILIZADA.....	122
GRADO 1	122
GRADO 2	122
GRADO 3	123
GRADO 4	123
GRADO 5	124

ANEXO III. MUESTRAS ANALIZADAS POR DAS ELISA.....	125
ANEXO IV. COMANDOS UTILIZADOS Y RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO EN PAUP*.....	129
1. COMANDOS PARA EVALUACIÓN DE AJUSTE DE MODELOS (PAUP*).....	129
2. SALIDA DEL AJUSTE DE MODELOS (MODELTEST).....	132
3. COMANDOS PARA ANÁLISIS DE ML (PAUP*)	133
4. COMANDOS PARA BOOTSTRAPPING DEL ÁRBOL DE ML (PAUP*)	134
5. COMANDOS PARA ANÁLISIS DE MP (PAUP*).....	134
6. COMANDOS PARA REALIZAR BOOTSTRAP DE LOS ÁRBOLES DE MP (PAUP*)	134
ANEXO V. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS EFECTUADOS EN EL SERVIDOR DATAMONKEY SITIO POR SITIO	135
1. VALORES D_N/D_S SITIO POR SITIO EN LAS POSICIONES 1-228.....	135
2. VALORES D_N/D_S SITIO POR SITIO EN LAS POSICIONES 229-FINAL.....	136
ANEXO VI. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PREDICCIÓN DE EPÍTOPES LINEALES POR BEPIPRED.....	140

Índice de Figuras

Figura 1. Síntomas de LD.....	5
Figura 2. Estructura genética de los ampelovirus.....	10
Figura 3. Países en los que se han reportado Ampelovirus del subgrupo I en vid, y año de la primera cita.....	36
Figura 4. Ubicación de los primers HSP-P1/2 diseñados por Tian et al sobre los dominios 1 y 2 de la fosfatasa de la HSP70h.....	38
Figura 5. Modelo de selección de primers con el algoritmo CODEHOP.....	39
Figura 6. Proceso de amplificación de fragmentos aleatorios por PCR.....	44
Figura 7. Posición de los primers utilizados sobre el genoma de la secuencia de referencia de GLRaV-5.....	45
Figura 8. Diseño de primers para los dominios 1 (A) y 2 (B) de la fosfatasa de HSP70h, mediante el programa CODEHOP.....	47
Figura 9. Amplificación por RT-PCR de la HSP70h de diversos Closterovirides, utilizando los primers CHP-S/A.....	48
Figura 10. Alineamiento múltiple del extremo 3' de la secuencia de nucleótidos (cursiva) y la secuencia de aminoácidos deducida (negrita) del ORF codificante para p60 de GLRaV-5.....	54
Figura 11. Evolución cronológica de la producción bibliográfica referida a LD.....	59
Figura 12. Membrana de nitrocelulosa revelada finalizado WB.....	66
Figura 13. Membranas de nitrocelulosa reveladas correspondientes a tres muestras con nítidos comportamientos diferenciales frente a los anticuerpos y antisueros utilizados.....	67

Figura 14. A) Producto de amplificación obtenido con los primers Ampelo CP Bis F/R;.....	84
Figura 15. Colony PCR-RFLP de transformaciones con productos de amplificación obtenido con los primers Ampelo CP Bis F/R clonados en pGEM T Easy	85
Figura 16. Alineamiento múltiple de los primeros 100 aminoácidos correspondiente a la CP completa de los aislamientos correspondientes a los grupos GLRaV-5-like y -6-like.....	90
Figura 17. Topología de los dos árboles determinados por GARD.	91
Figura 18. Distribución de los sitios identificados bajo presión de selección en los primeros 100 aminoácidos de las secuencias consideradas.....	93
Figura 19. Árbol filogenético obtenido por ML.	95
Figura 20. Representación de la ubicación de los epítopes lineales predichos por Bepipred.	97
Figura 21. Representación de los valores promedios para todas las secuencias consideradas, obtenidos por Bepipred.	98
Figura 22. Confrontación de los resultados de WB y la filogenia estimada por ML	104
Figura 23. Árboles filogenéticos obtenidos por ML	106
Figura 24. Representación de los valores medios obtenidos por Bepipred confrontados con los sitios inferidos como bajo distinto tipo de presión de selección en los primeros 100 aminoácidos de la CP de los ampelovirus analizados.....	107

Índice de tablas

Tabla I. Taxonomía de los virus asociados a Leafroll Disease	8
Tabla II. Antisueros policlonales utilizados en pruebas serológicas	18
Tabla III. Anticuerpos monoclonales utilizados en pruebas serológicas	19
Tabla IV. Secuencias utilizadas para el diseño de primers para HSP70h mediante CODEHOP	41
Tabla V. Identidad aminoacídica entre la secuencia de HSP70h del aislamiento presente en cv. Red Globe y las secuencias homologas de ampelovirus del subgrupo I	53
Tabla VI. Identidad aminoacídica entre la secuencia de p60 del aislamiento presente en cv. Red Globe y las secuencias homologas de ampelovirus del subgrupo I	53
Tabla VII. Identidad aminoacídica entre la secuencia de CP del aislamiento presente en cv. Red Globe y las secuencias homologas de ampelovirus del subgrupo I	53
Tabla VIII. Secuencias de CP de ampelovirus del subgrupo I asociados a LD depositadas en bases de datos con información sobre su reactividad serológica	58
Tabla IX. Antisueros y anticuerpos desarrollados contra ampelovirus del subgrupo I asociados a LD y su especificidad	60
Tabla X. Muestras utilizadas para análisis de Western Blot, indicando su reactividad en ELISA.	65
Tabla XI. Reactividad de las muestras analizadas en Western Blot. “t”: banda tenue	68

Tabla XII. Muestras utilizadas para análisis de RT-PCR, indicando su reactividad en ELISA.	76
Tabla XIII. Resultados de RT-PCR y colony blot PCR-RFLP sobre las muestras de vid analizadas. NT: restricción no realizada. NS: muestra no secuenciada	86
Tabla XIV. Valores de identidad aminoacídica entre secuencias de la CP pertenecientes a distintos grupos. Secuencia completa.....	87
Tabla XV. Valores de identidad aminoacídica entre secuencias de la CP pertenecientes a distintos grupos. Primeros 24 aminoácidos (N-terminal)	88
Tabla XVI. Valores de identidad aminoacídica entre secuencias de la CP pertenecientes a distintos grupos. Desde posición 25 hasta final (C-terminal)	88
Tabla XVII. Valores de d_N/d_S obtenidos por SLAC y REL desde los tres conjuntos de datos considerados	92
Tabla XVIII. Estimación de la divergencia evolutiva sobre pares de secuencias dentro de cada y entre grupos. Número de sustituciones por sitio promedio entre todos los pares de secuencias dentro de cada y entre grupos. Los resultados están basados en análisis de 62 secuencias apareadas. Las estimaciones de los errores estándar se muestran entre paréntesis, fueron obtenidos por un proceso de bootstrap de 1000 réplicas.	96

Abreviaturas

μ M	Micromolar
aa	Aminoácido
AS	Antisuero
bp	Par de bases
cDNA	DNA copia
CP	Cápside protéica
CPm	Cápside protéica duplicada
cv	Cultivar
d _N	Relación de sustituciones de codones no sinónimos
dNTP	Mezcla equimolar de 4 deoxynucleótidos fosfato
d _s	Relación de sustituciones de codones sinónimos
dsRNA	RNA de doble cadena
EDTA	Etilen diamino tetracetato de sodio
EtOH	Etanol
g	Gramo
GLRaV	Grapevine leafroll associated virus
Has	Hectáreas
ICVG	International Council for the Study of Virus and Virus-like diseases of Grapevine
ISEM	Microscopía electrónica de immuno-adsorción
Kb	Kilo base
KDa	Kilo Dalton
LD	Leafroll Disease
Mab	Anticuerpo monoclonal
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros

nt	Nucleótido
ORF	Marco abierto de lectura
p	Valor de probabilidad
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBST	Buffer fosfato sodio tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVP-40	Polyvinilpirrolidona 40KDa
RCF	Fuerza relativa de centrifugación
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
RT	Transcripción inversa
SDS	Sodio dodecyl sulfato
ssRNA	RNA de simple cadena
STE	Buffer Sodio Tris EDTA
Tn	Tonelada
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
ul	Microlitro
um	Micrón
V	Volt
WB	Western Blot

Capítulo I: INTRODUCCIÓN

I.1 EL CULTIVO DE LA VID

I.1A Historia de la viticultura

La vid europea (*Vitis vinifera* L.) es el frutal más ampliamente cultivado en el mundo entero. Se supone que su centro geográfico ha sido Europa oriental y Cercano Oriente, asumiendo en Armenia como el lugar de origen más definido. La domesticación de esta especie se remonta a los años 8.000-6.000 AC en la región Transcaucásica, y a partir de allí, su cultivo se propagó en el resto de Europa, principalmente, los países mediterráneos (Riaz *et al.* 2007). La introducción de la vid en el nuevo mundo fue de la mano de los conquistadores españoles y portugueses, quienes en el siglo XVI establecieron su cultivo en el actual Méjico y Perú. Una importante parte de los materiales introducidos fueron generados a partir de semillas, originando lo que se conoce como variedades “criollas”. Fue desde Perú que se introdujo la vid a la Argentina, en un primer momento en la provincia de Santiago del Estero, hacia mediados del siglo XVI; y posteriormente, también a través de Chile, en las provincias cordilleranas de Mendoza, San Juan y Salta (Martínez *et al.* 2006). Hacia fines del siglo XIX se inicia en la provincia de Mendoza, un proceso de reconversión de la vitivinicultura, dirigido a la producción de vinos de mayor calidad. En el marco de este proceso, además de la incorporación de novedosas tecnologías de procesamiento, se produjo la introducción de variedades de alto valor enológico, superiores a las variedades criollas ampliamente distribuidas en nuestro país. El ingreso de estos materiales, ya sí en forma de material de propagación agámico, se realizó mayormente desde Francia, Italia y España.

I.1B Importancia de la viticultura

En el año 2007 existían 7,7 millones de hectáreas implantadas con vid en todo el mundo, siendo los países más importantes España, Francia e Italia, concentrando cerca del 37% del total mundial. La producción anual de uva asciende a 67 millones de toneladas (OIV 2010).

La República Argentina siempre ha sido uno de los primeros 10 países vitícolas del mundo, tanto en niveles de producción de uva y vino, como así también de consumo interno. La vid es el frutal más importante en nuestro país, seguido en

importancia por los cítricos como conjunto. La superficie cultivada es de 225.000 Has, concentradas principalmente en las provincias de Mendoza (70%) y San Juan (21%), y en menor medida, en valles cordilleranos de las provincias andinas (Salta, La Rioja y Río Negro). Esta concentración lleva a que la vitivinicultura sea un actor muy importante en el producto bruto geográfico de las provincias mencionadas. La producción anual de uva, que alcanzó un pico superior a los tres millones de toneladas en el año 2007, se destina principalmente (mas de un 95%) a la industria vitivinícola (elaboración de vinos, y en menor medida, mosto concentrado, jugos y aguardientes). Además un aporción se orienta a la producción de uva para consumo en fresco (40-50.000 Tn anuales) y pasas (60-70.000 Tn anuales)(INV 2008).

I.1C Sanidad del viñedo argentino

La vid, por la distribución de su cultivo en el mundo, es afectada por diversos patógenos en distintas regiones, dependiendo de las condiciones ambientales. Históricamente, la viticultura argentina ha sido considerada de muy buena sanidad, dada la baja frecuencia e incidencia de plagas y enfermedades en general. En las principales condiciones de cultivo de la vid en nuestro país, son pocas las enfermedades criptogámicas y bacterianas descritas. Las enfermedades fúngicas más importantes son la Peronospera y el Oidio, dentro de las llamadas enfermedades de canopia (Pizzuolo *et al.* 2008); siendo importantes en algunas condiciones de cultivo (variedades, sistema de conducción condiciones climáticas) las podredumbres causadas por *Botrytis cinerea* (Muñoz *et al.* 2010). Otra enfermedad importante es la causada por hongos de madera llamada “Hoja de Malvón” (Gatica *et al.* 2000). La única enfermedad de significancia causada por bacterias en vid en la Argentina, es la Agalla de corona (Cucchi and Becerra 2009), no habiéndose registrado hasta el momento la ocurrencia de enfermedades causadas por bacterias fastidiosas (Pierce Disease’s) y por fitoplasmas.

I.2 ENFERMEDADES VIRALES DE LA VID

Por la naturaleza perenne del cultivo y por su propagación agámica, la vid es una de las plantas cultivadas en las que se ha registrado mayor número de especies virales en forma natural. Hasta el momento la cuenta de los mismos asciende a 60

especies virales distintas, muchas veces encontradas en infecciones mixtas (Martelli 2009). Si bien muchos de estos virus son patógenos muy importantes en otros huéspedes (por ejemplo Tomato Spotted Wilt Virus, Tomato Mosaic Virus, Potato Virus Y, muy importantes en solanáceas), en la vid no pasan de ser una mera curiosidad científica por su poca frecuencia o muy bajo efecto en la planta. Las enfermedades más importantes causadas por virus en vid son tres: la degeneración infecciosa (Court-noué o Fanleaf), el complejo de madera rugosa (Bois strié o Rugose wood complex) y el enrollado de la hoja (enroulement viral o leafroll disease).

I.3 ENROLLAMIENTO DE LA HOJA

La enfermedad conocida como enrollamiento de la hoja (o leafroll disease, en adelante LD) es conocida desde mediados del siglo XIX. El nombre de la enfermedad en los distintos idiomas (rollkrankheit, enroulement, accartocciamento foliare, zavijanje listov, enrolamento da folha da videira, etc.) hacen referencia al síntoma foliar característico de la enfermedad. Este consiste en un enrollamiento de la lámina de la hoja hacia la cara abaxial, comenzando en las hojas basales del brote hacia mediado de la temporada vegetativa (Enero en las condiciones de Mendoza) y progresando hacia el extremo del brote. En variedades de uva tinta, el síntoma es más fácilmente identificable por la coloración rojo violáceo de las hojas afectadas; comenzando por pequeñas manchas o parches, que evolucionan hasta cubrir todo el espacio internerval de la hoja. En variedades de uva blanca y rosada, esta coloración no se observa, acompañando al enrollamiento una clorosis leve del área internerval (Figura 1).

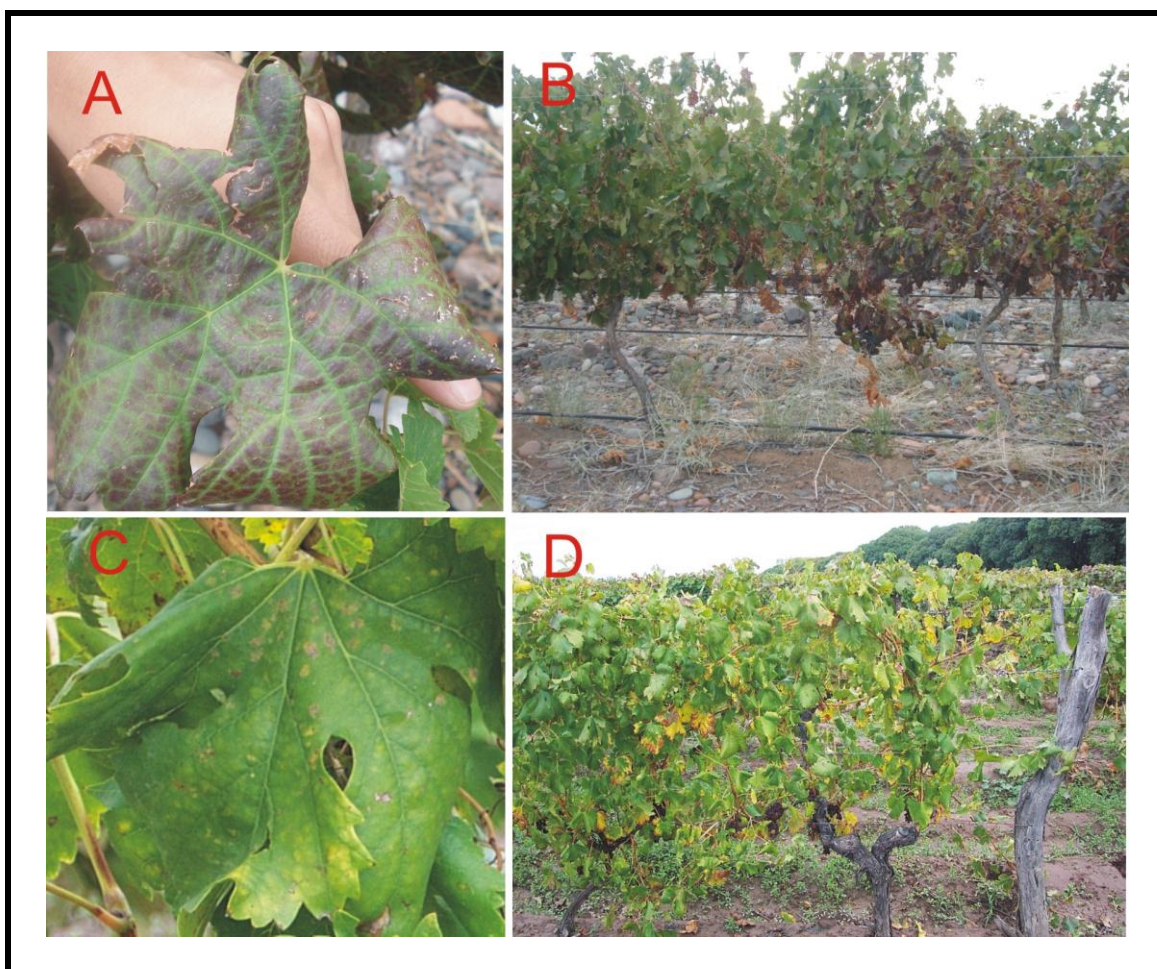


Figura 1. Síntomas de LD. a) Hoja de la variedad tinta Merlot, mostrando los síntomas típicos de la enfermedad. b) Aspecto de una planta de la variedad tinta Merlot, al lado de una planta sana de la misma variedad. c) Hoja de una variedad blanca no identificada, mostrando síntomas de la enfermedad. d) Aspecto de una planta de variedad blanca no identificada, al lado de una planta asintomática.

Al igual que todas las enfermedades en vegetales, el desarrollo de la misma y sus efectos en la producción son el resultado de la interacción entre el genotipo del huésped, el genotipo del patógeno y el ambiente en que se encuentra la planta (entendiéndose por ambiente las condiciones climáticas, de suelo, de cultivo, ocurrencia de otros estrés, etc.). De esta manera, los daños reportados son muy variables, pero siendo siempre más severos en variedades tintas y de ciclo tardío. Por ejemplo, se ha descrito que la infección con LD de la variedad Riesling no modifica parámetros vegetativos y de producción como peso de poda, volumen de cosecha, ni acidez del mosto, pero sí el grado azucarino del mismo (Wolpert and Vilas

1992). Por otro lado, sí se observaron disminuciones significativas en el volumen de cosecha y en el grado azucarino del mosto, comparando plantas infectadas y sanas de las variedades Pinot Noir y Chardonnay (Walter and Legin 1986). Sin embargo uno de los efectos más perjudiciales en el contexto actual de la vitivinicultura, donde prima la calidad de la materia prima, es su incidencia en la acumulación en la uva de sustancias asociadas a características organolépticas del vino (antocianos y polifenoles) (Guidoni *et al.* 1997; Lee and Martin 2009).

I.3A Etiología de LD

La naturaleza viral de la enfermedad fue postulada en el año 1936 (Goheen 1970), pero no fue hasta el año 1979 que por primera vez se asoció un miembro del entonces género Closterovirus a la enfermedad, por la observación de partículas filamentosas en los tejidos de plantas infectadas con LD (Namba *et al.* 1979c). Esta observación inicial fue posteriormente confirmada por varios informes, aunque las discrepancias acerca del tamaño de las partículas virales impidieron, en un primer momento, aclarar la etiología de LD. El desarrollo de antisueros permitió iniciar un camino tendiente a definir dicha controversia. Gugerli *et al.* (1984) fueron los primeros en desarrollar un antisuero reactivo contra las partículas filamentosas previamente identificadas en tejidos enfermos, y su aplicación en DAS ELISA asoció estas partículas a LD, pero demostró también que algunos casos de LD no reaccionaban con este antisuero. Este trabajo dio base a la suposición de distintos, en principio, serotipos virales asociados a la enfermedad, lo que se confirmó poco tiempo después (Hu *et al.* 1990b; Zimmermann *et al.* 1990a). La imposibilidad de transmitir mecánicamente estos virus desde vid a huéspedes herbáceos, dificultó su purificación y por lo tanto los avances en la etiología de LD siempre fueron lentos en comparación con las enfermedades causadas por clostero-like virus en otros cultivos (cítricos, por ejemplo). Durante la década de los 90 se desarrollaron anticuerpos monoclonales (Mabs) que permitieron clarificar las relaciones dentro de los closterovirus asociados a LD (Hu *et al.* 1990a; Gugerli and Ramel 1993; Gugerli *et al.* 1997b). Como resultado de estos trabajos, hacia el año 1995 se definió la taxonomía de los virus asociados a LD, denominándolos *Grapevine Leafroll associated Virus* (GLRaV) 1 - 6, en base a las relaciones serológicas entre ellos (Boscia *et al.* 1995).

Posteriormente, y basados mayormente en estudios del genoma de los virus, se describieron tres nuevas especies (GLRaV-7, 8 y 9) (Choueiri *et al.* 1996; Monis and Bestwick 1997; Alkowni *et al.* 2004). A la luz del volumen de información biológica y molecular generada para un número importante de miembros del entonces género *Closterovirus*, la taxonomía de la familia *Closteroviridae* (compuesta por el mencionado género *Closterovirus* y el género *Crinivirus*) fue revisada, proponiéndose la creación del nuevo género *Ampelovirus*, en base a caracteres moleculares (diferencia en el orden de los genes estructurales en el genoma, genoma monopartito con duplicación de la proteínasa líder) y biológicos (transmitidos por cochinillas harinosas) (Martelli *et al.* 2002). En los últimos años, y aprovechando el desarrollo de técnicas moleculares de clonación, un número importante de nuevas supuestas especies virales han sido descritas en el género *Ampelovirus*, pero su estado taxonómico como especies definitivas, todavía debe ser discutido (Maliogka *et al.* 2008b; Elbeaino *et al.* 2009; Maliogka *et al.* 2009; Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.* 2010).

I.4 TAXONOMÍA DE GRAPEVINE LEAFROLL ASSOCIATED VIRUS EN LA FAMILIA CLOSTEROVIRIDAE

Una vez establecido el nuevo género *Ampelovirus* dentro de la familia *Closteroviridae*, la totalidad de las nuevas especies asociadas a LD registradas en los últimos años se han asignado tentativamente a este género. Las únicas especies no asignadas al género *Ampelovirus* son GLRaV-2 (*Closterovirus*) y GLRaV-7 (no asignada a ningún género). La situación actual de los GLRaV's se refleja en la Tabla I.

Tabla I. Taxonomía de los virus asociados a LD

Género (Especie tipo) (Martelli <i>et al.</i> 2002)	Especies definitivas (Martelli <i>et al.</i> 2002)	Especies Tentativas (Martelli <i>et al.</i> 2002)
<i>Closterovirus</i> (<i>Beet Yellow Virus</i>)	GLRaV-2	
		GLRaV-4 GLRaV-6 GLRaV-8
<i>Ampelovirus</i> (<i>Grapevine Leafroll associated Virus 3</i>)	GLRaV-1 GLRaV-3 GLRaV-5	GLRaV-9 (Alkowni <i>et al.</i> 2004) GLRaV-De (Maliogka <i>et al.</i> 2008b) GLRaV-Pr (Maliogka <i>et al.</i> 2009) GLRaV-Cyp1 (Elbeaino <i>et al.</i> 2009) GLRaV-Carn (Abou Ghanem- Sabanadzovic <i>et al.</i> 2010)
Especies no asignadas en la familia	GLRaV-7	

I.4A Género *Ampelovirus*

La creación del género *Ampelovirus* (del griego *Ampelos*: vid) fue propuesta inicialmente por Karasev (2000) quien al realizar análisis filogenéticos sobre las secuencias disponibles de la helicasa, RNA polimerasa RNA dependiente (RDRP) y la proteína homóloga de shock térmico de 70 KDa (HSP70h) de distintos closterovirus y crinivirus, observó agrupamientos en función de los insectos vectores de los virus, conformando 3 grupos bien claros: virus transmitidos por moscas blancas (*Crinivirus*), virus transmitidos por áfidos (*Closterovirus*) y virus transmitidos por cochinillas harinosas (en ese entonces asignados al género *Closterovirus*). Como el autor menciona, siempre existieron dificultades para la clasificación de estos virus por dos razones principales: la dificultad de contar con un material adecuado para una caracterización profunda (dado los escasos rendimientos obtenidos de las purificaciones) y la mala elección de criterios para la definición de especies. En consecuencia, Karasev propone la creación de un nuevo género *Vinivirus* dentro de la familia, al cual se asignarían los virus transmitidos por cochinillas harinosas. Esta proposición fue posteriormente aceptada por el grupo de estudio de *Closterovirus* y virus relacionados de ICTV (Martelli *et al.* 2002), creando el género *Ampelovirus* (se reemplazó la propuesta de *Vinivirus*, por ser un nombre muy similar al del ya existente y no relacionado género *Vitivirus*), definiéndose como

especie tipo a GLRaV-3. Posteriormente a la creación del género un número muy importante de nuevas especies tentativas fueron descritas, principalmente provenientes de vid (GLRaV's) y de piña (*Pineapple Mealybug Wilt associated Virus*, PMWaV). En función de estos trabajos, y con la información generada, recientemente Maliogka et al (2008a) propusieron la existencia de dos subgrupos dentro del género *Ampelovirus*, englobando en el subgrupo I, un número importante de aislamientos virales, con algún grado de relación serológica. A este subgrupo pertenecen los poco caracterizados hasta ahora GLRaV- 4, 5, 6, 9, Pr, De, Cyp1 y Carn. Estas supuestas especies han sido descritas en casi todas las regiones vitivinícolas del mundo (USA, Italia, Francia, otros países mediterráneos, Chile, China, etc.). A este subgrupo también pertenece el PMWaV-1. Al subgrupo II del género *Ampelovirus*, se asignaron GLRaV-1,-3, PMWaV-2, *Little Cherry Virus-2* y *Fig Latent Mosaic associated Virus-2*.

1.4A.1 Estructura genética de los ampelovirus

Los ampelovirus son virus de genoma monopartito de RNA de simple cadena de sentido positivo. Como se menciona anteriormente se han descrito dos subgrupos, perteneciendo al subgrupo II la especie tipo del género (GLRaV-3) y al subgrupo I un número de virus con importantes diferencias genéticas. Ambos subgrupos comparten un núcleo de genes comunes a los otros miembros de la familia *Closteroviridae*. El ORF 1 codifica para una proteína con dominios de metiltransferasa de RNA (MET) y de helicasa de RNA (HEL), con una región interna altamente variable. Mediante un cambio de marco de lectura (frameshift) ribosomal, se permite la expresión de un tercer dominio de polimerasa de RNA (RdRp). Este módulo MET-HEL-RdRp es común no solo a los miembros de la familia *Closteroviridae* sino también a todos los miembros de la familia de los alphavirus-like. Posteriormente se encuentran una serie de ORF que serían expresados mediante RNA subgenómicos. El ORF codificante para la p6 es común a los dos subgrupos, como así también el orden de las secuencias de la proteína homóloga HSP70 (HSP70h), la proteína de 55-60 KDa y la proteína de cápside (CP). En el subgrupo I se observa una última proteína de un tamaño de 23 KDa, la cual no presenta identidad de significancia con la proteína de cápside duplicada (CPd),

presente en el resto de los miembros de la familia, ni con la CP. La ausencia en esta proteína de 23KDa de dominios conservados o de los motivos típicos de cápside de closterovirides, hace suponer que no se corresponde con la CPM. En la figura 2 se observan las diferencias en la estructura de miembros de los dos subgrupos, destacándose la ausencia de 5 ORF 3'terminales en GLRaV-Pr. La función de estas 5 proteínas no es completamente clara, pero esa ausencia es compartida por los distantemente relacionados *Crinivirus*, de genoma dividido.

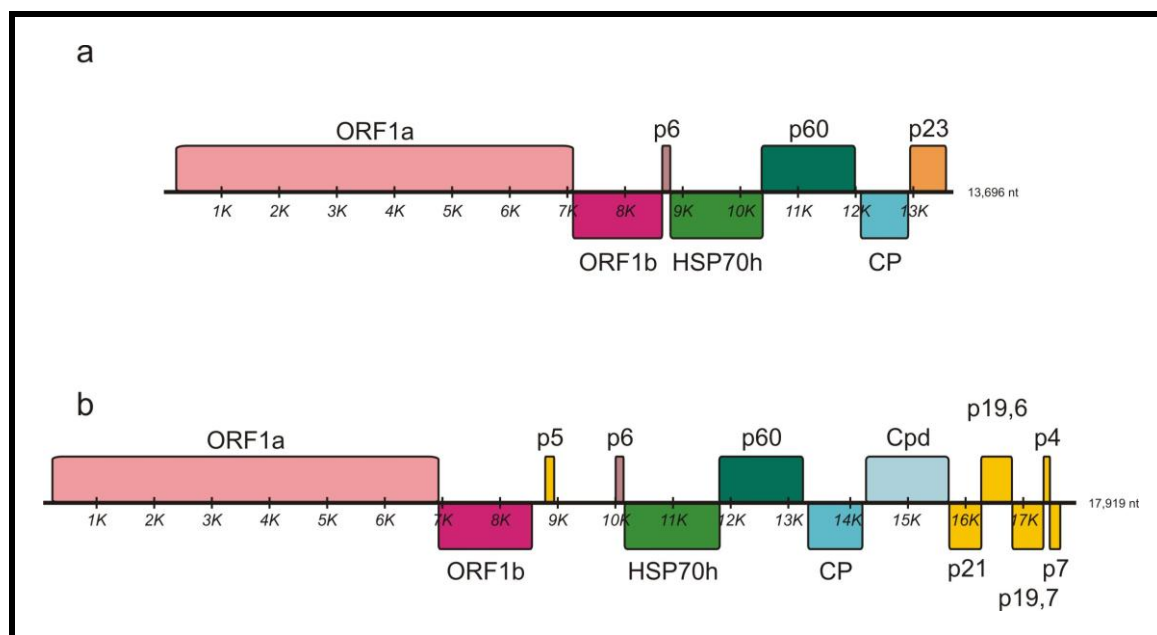


Figura 2. Estructura genética de los ampelovirus. a) Genoma de GLRaV-Pr, Acc. NC_011702 (Subgrupo I). b) Genoma de GLRaV-3, Acc. NC_004667 (Subgrupo II). ORF en mismo color son parálogos entre los dos subgrupos. En amarillo se indican ORF no presentes en los Ampelovirus del subgrupo I.

1.4A.2 Epidemiología y transmisión

El estudio de los virus asociados a LD en vid se vio inicialmente rezagado por la imposibilidad de lograr purificaciones limpias de estos virus a partir de vid, y por la incapacidad de transmisión a huéspedes herbáceos de la mayoría de las especies virales asociadas a la enfermedad. Hasta el momento, solamente tres aislamientos de GLRaV-2 han sido transmitido con algún éxito a *Nicotiana benthamiana* (Goszczyński *et al.* 1996; Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.* 2000). Ninguno de los ampelovirus de vid (ya sea del subgrupo I o II) han logrado ser transmitido a otro huésped más que a especies del género *Vitis*.

GLRaV-1, 3, 5 y Cyp1 han sido eficientemente transmitidos por distintas especies de cochinillas harinosas (*Planococcus ficus*, *P. citri*, *Pseudococcus longispinus*, *Ps. calceolariae*, *Ps. viburni*, *Ps. maritimis*, *Helicococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris*, y *Ps. comstocki*) (Sforza *et al.* 2003; de Borbon *et al.* 2004; Elbeaino *et al.* 2009; Buzkan *et al.* 2010), de la misma manera que distintas especies de PMWaV (Gambley *et al.* 2008), lo que hace suponer que el resto de los miembros del género compartirían esta característica.

1.4A.3 Serología de miembros del subgrupo I

El primer miembro del actual subgrupo I de *Ampelovirus* en ser descrito fue GLRaV-4, a partir del cual se desarrolló un antisuero que permitió discriminarlo de los hasta ese entonces descritos GLRaV tipo I, II y III (Hu *et al.* 1990b) (inicialmente se utilizó tipografía romana para la nomenclatura, la cual fue reemplazada por números arábigos tras la redefinición de la taxonomía (Boscia *et al.* 1995)). Casi simultáneamente, se desarrolló un antisuero a partir de tejidos infectados con un virus no reconocido por los antisueros disponibles hasta el momento, que se llamó en ese momento también GLRaV-4, pero al no estar serológicamente relacionado con el anterior, se denominó GLRaV-5 (Zimmermann *et al.* 1990a). Posteriormente, Gugerli *et al.* (1997b) comunicaron que en la accesión de vid original sobre la que se describió GLRaV-2, estaba presente otra especie viral (en un primer momento se informaron cápsides de dos tamaños distintos), la cual fue caracterizada mediante anticuerpos monoclonales, y se llamó GLRaV-6. Hasta ese momento existía una gran confusión en la taxonomía de los virus asociados a LD, lo cual fue aclarado por Boscia *et al.* (1995), adoptándose desde ese momento la nomenclatura actual de los GLRaV. Al momento de la descripción de GLRaV-9, no se desarrollaron antisueros contra el mismo, pero por identidad de secuencias y ausencias de reacciones serológicas con antisueros contra GLRaV-4 y 5, se lo postuló como una nueva especie. Posteriormente el desarrollo de anticuerpos monoclonales para este virus, permitieron confirmar este postulado inicial (Gugerli *et al.* 2009). Finalmente, Maliogka *et al.* describieron el aislamiento GLRaV-Pr, el que también presentaba falta de reacción con diversos antisueros y anticuerpos disponibles, para el cual se

desarrollo un antisuero a partir de la CP recombinante expresada en bacterias (Maliogka *et al.* 2009).

El estado actual referido a los antisueros y anticuerpos desarrollados contra los distintos virus asociados a LD fue revisado recientemente (Gugerli 2009). De este trabajo, se desprende que es necesario un trabajo de elaboración sobre los distintos anticuerpos y antisueros desarrollados contra distintos aislamientos virales, y conjugar esta información con datos de secuencias, de manera de clarificar el estado taxonómico de las especies ya descritas y los nuevos aislamientos a describir dentro del subgrupo I del género Ampelovirus. Muchas de las especies descritas recientemente del subgrupo I de los Ampelovirus, no poseen suficiente información genética (GLRaV-6) o serológica (GLRaV- Cyp1, GLRaV-De) como para concluir definitivamente si son o no una nueva especie.

1.4A.4 Variabilidad genética y relaciones filogenéticas dentro del subgrupo I

Hasta el momento, se han descrito 8 supuestas especies distintas dentro del subgrupo I asociadas a LD, habiéndose secuenciado el genoma casi en su totalidad en 4 de ellas (GLRaV-9 (Alkowni *et al.* 2004), GRLaV-Pr (Maliogka *et al.* 2009), GRLaV-Cyp1 (Elbeaino *et al.* 2009) y GLRaV-Carn (Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.* 2010)), y existiendo solo secuencias parciales del resto, principalmente del ORF codificante para HSP70h y en menor medida, de la CP y otros ORF. Estas secuencias se han usado para hacer reconstrucciones filogenéticas, las cuales soportan el agrupamiento de estas supuestas especies como un subgrupo dentro del género. Se ha observado que hay un mayor grado de conservación en la CP que en la HSP70h (Maliogka *et al.* 2008a), pero el número de secuencias consideradas, sobre todo en lo que refiere a la CP es bajo como para tener una idea de la variabilidad genética dentro del grupo. Considerando la totalidad del subgrupo I, los niveles de divergencia nucleotídica son de 7-23% en la CP (para 7 secuencias disponibles), mientras que en especies como GLRaV-2, con este valor varía entre 1 y 23% (sobre 24 secuencias disponibles) (Martelli 2009). Estos valores indican la necesidad de redefinir el estado taxonómico de las especies de este subgrupo.

La combinación de datos de secuencia de la CP y las reacciones serológicas manifestadas por estos aislamientos podría ser un método adecuado para la definición de especies, ya que las reacciones serológicas por si solas no serian suficientes. Se ha descrito que anticuerpos monoclonales reaccionan con virus tan distintos como GLRaV-1 y 3 (Seddas *et al.* 2000). Así mismo, el uso de anticuerpo monoclonales, no permite un claro discernimiento entre las especies del subgrupo I (Gugerli 2009). En otras especies de la familia se ha determinado que anticuerpos monoclonales permiten la discriminación entre razas severas y débiles, diferencia que puede residir en la presencia de un solo aminoácido (Pappu *et al.* 1993).

OBJETIVOS

Como se ha detallado en la introducción, LD es una enfermedad muy importante en el cultivo de la vid, para la cual se ha descrito un número muy grande de virus asociados, la mayoría de los cuales ha sido asignado tentativa o definitivamente al género *Ampelovirus*, dentro de la familia *Closteroviridae*. Estudios filogenéticos elaborados sobre la escasa información genética disponible hasta el momento, han permitido postular la existencia de dos subgrupos de supuestas especies virales. Sin embargo, la información tanto molecular como biológica (principalmente referido a la serología de los mismos) no permite definir claramente el estado taxonómico de estas supuestas especies virales, ya que no se cumple en su totalidad con los criterios de demarcación de especies en la familia.

Es necesario definir adecuadamente la taxonomía de las especies virales asociadas a LD, ya que este es el primer paso hacia el diagnóstico certero de la enfermedad. Existe un número importante de reactivos serológicos y técnicas moleculares de diagnóstico (basadas en PCR) que permiten identificar algunos de los virus pertenecientes al subgrupo I del género *Ampelovirus*.

En función de esto, se plantean los siguientes objetivos para este trabajo:

Objetivo 1: Confirmar la ocurrencia en la Argentina de ampelovirus del subgrupo I asociados a la enfermedad leafroll de la vid.

Objetivo 2: Caracterizar serológicamente los aislamientos identificados con los anticuerpos desarrollados para los miembros de este subgrupo

Objetivo 3: Analizar la variabilidad genética del gen codificante para la cápside protéica de estos aislamientos

Objetivo 4: Mediante la integración de los datos moleculares y serológicos, definir la taxonomía de los aislamientos estudiados

Para lograr estos objetivos se plantean las siguientes actividades:

Objetivo 1:

Diseñar primers sobre la región altamente conservada de la HSP70h, que permitan identificar nuevas especies de ampelovirus.

Secuenciar los fragmentos obtenidos correspondientes a muestras que no estén infectadas con GLRaV-1, 2 o 3

Completar la secuencia de al menos un aislamiento de ampelovirus del subgrupo I, correspondiente a los ORF codificantes para HSP70h, p60 y CP

Objetivo 2

Analizar mediante ELISA y Western blot los aislamientos argentinos identificados, de manera de tipificarlos serológicamente

Objetivo 3

Diseñar primers flanqueantes a la CP de los ampelovirus del subgrupo I, que permitan amplificar la CP completa del mayor número posible de especies

Secuenciar y analizar los amplicones obtenidos

Objetivo 4

Realizar un análisis filogenético, determinar el grado de variabilidad genética entre los aislamientos y evaluar si existe evidencia de algún tipo de presión de selección durante la historia evolutiva de los mismos

Capítulo II: **MATERIALES Y MÉTODOS**

II.1 MATERIAL BIOLÓGICO

II.1A Aislamientos virales

Los aislamientos utilizados en este estudio se obtuvieron de la colección ampelográfica de la EEA Mendoza INTA. Esta colección fue inicialmente instalada en el año 1970, y en el año 2007/8 fue transplantada a un nuevo sitio. Contiene actualmente un total de 670 variedades de *V. vinifera* y otras especies del género *Vitis*. La colección fue relevada en el año 2004 para identificar la ocurrencia de síntomas de LD, los cuales fueron tipificados en una escala de severidad de 1 a 5 (5 más severo). Las plantas que registraron síntomas de LD fueron sometidas a análisis moleculares y serológicos descriptos más adelante.

II.1B Antisueros policlonales

En los estudios serológicos se utilizaron distintos antisueros obtenidos a partir de inmunización con ampelovirus diversos. Algunos anticuerpos se obtuvieron de kits de diagnóstico comercializados actualmente, y otros directamente del laboratorio obtentor (Tabla II).

Tabla II. Antisueros policlonales utilizados en esta tesis

Antisuero	Procedencia	País	Antígeno	Referencia
AS GLRaV-6	Bioreba AG	Reinach, Suiza	Chasselas 8/22 (GLRaV-2 + 6)	(Gugerli <i>et al.</i> 1997b)
AS GLRaV-5	Sediag SAS	Longvic, Francia	White Emperor (GLRaV-5)	(Zimmermann <i>et al.</i> 1990a)
AS-252 IL	Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi	Bari, Italia	Koudsi Y252 (GLRaV-4)	(Saldarelli <i>et al.</i> 2006)

II.1C Anticuerpos monoclonales

Para una caracterización en profundidad de los materiales en estudio se utilizó una batería de anticuerpos monoclonales, en su mayoría no disponibles comercialmente todavía (Tabla III).

Tabla III. Anticuerpos monoclonales utilizados en esta tesis

Anticuerpo	Presentación	Procedencia	Antígeno	Referencia
Mab 43-1-1-1-3	Sobrenadante de Hybridomas		White Emperor V.C.A 2v18	(Gugerli and Ramel 1993)
Mab 3-3-4-6-3	S.Hyb	Station de Recherche Agroscope Changins-Wädenswil	(GLRaV-5)	(Besse <i>et al.</i> 2009)
Mab 8-2-1-4-2	IgG Purificada	ACW, Nyon, Suiza		(Besse <i>et al.</i> 2009)
Mab 36-117	S.Hyb		Chasselas 8/22 (GLRaV-2 + 6)	(Gugerli <i>et al.</i> 1997b)
Mab 3-1-2	S.Hyb		Thompson Seedless V.C.A2v22 (GLRaV-4)	(Besse <i>et al.</i> 2009)
GLRaV-6 AP	IgG Purif Conjugada AP		Chasselas 8/22 (GLRaV-2 + 6)	(Gugerli <i>et al.</i> 1997b)
GLRaV-4-9	Combinación de IgG Purif	Bioreba Reinach, Suiza	Thompson Seedless V.C.A2v22 (GLRaV-4) Cabernet Suvignon (GLRaV-9)	(Besse <i>et al.</i> 2009)

II.1D Cepas bacterianas

Durante el desarrollo del trabajo se utilizaron diversas cepas de *E.coli*, en función de requerimientos precisos en cada momento. Las mismas se detallan a continuación

DH5 α (genotipo fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17). Bacteria para clonación general, presenta como principales ventajas la mutación endA1, la cual disminuye la ocurrencia de endonucleasas intracelulares que pueden

degradar el DNA plasmídico; y $\Delta(\text{lacZ})\text{M15}$ que es el aceptor alpha necesario para el screening blanco/azul utilizando vectores basados en el operon lacZ. Origen: Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, CONICET-UNLP.

Top10 (genotipo: F- mcrA $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$ $\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ ΔlacX74 nupG recA1 araD139 $\Delta(\text{ara-leu})7697$ galU galK1 rpsL(Str^R) endA1). Bacteria derivada de la cepa DH10B. Usada para clonación general. Presenta como ventaja sobre DH5 α , que no es necesario suplementar con IPTG para inducir el screening por alpha-complementación. Origen: Invitrogen, USA

Mach1™-T1® (genotipo: F- $\phi 80(\text{lacZ})\Delta\text{M15}$ ΔlacX74 hsdR(rK-mK+) $\Delta\text{recA1398}$ endA1 tonA). Bacteria derivada de la cepa wild-type W (ATCC #9637), tiene una velocidad de crecimiento muy alta. Permite obtener colonias visibles de un cultivo plaqueado en medio selectivo con ampicilina en 8 horas. No necesita IPTG para inducir alpha-complementación. Origen : Invitrogen, USA

II.1E Vectores de clonación

Durante todos los experimentos de clonación de cDNA derivado de PCR, se utilizó el vector pGEM-T easy. Este vector, derivado del pGEM-5Zf(+) es un “vector T”, esto es, en su presentación linearizado tiene una adición de timidina 3' terminal, la cual permite el clonado directo de productos de PCR generados con Taq polimerasa (los cuales poseen una adenina en el extremo 3' terminal). Este vector presenta sitios de hibridación para primers genéricos de secuenciación (T7, SP6, M13). El sitio de inserción esta dentro de la región codificante para el α -péptido de la β -galactosidasa, lo que permite identificar colonias con inserto por color. También presenta sitios de restricción de EcoRI flanqueantes al sitio de inserción, permitiendo con una sola restricción escindir el inserto. Tiene el gen de resistencia a ampicilina. Origen: Promega, USA

II.2 SOLUCIONES, BUFFERS Y MEDIOS DE CULTIVO

En todos los casos, salvo aclaración, las soluciones fueron preparadas con agua bidestilada, las concentraciones se expresan en moles o milimoles por litro final (M o mM), y fueron esterilizadas por autoclavado 20 minutos a 121°C. Los pH se ajustaron con ClH diluido 1:3 o 10%, o con HONa 10N o 1N de acuerdo a lo necesario, previo al ajuste a volumen final.

II.2A Purificaciones de dsRNA

II.2A.1 STE 10X

Cloruro de Sodio 1M
Tris Base 100mM
EDTA 10mM
pH 8.0 (ClH)

II.2A.2 STE 1X y STE 2X

Dilución 1:10 (STE 1X) o 1:5 (STE 2X) a partir de STE 10X en agua

II.2A.3 STE 1X EtOH

STE 10X 100ml
H₂O 728 ml
Después de autoclavar agregar Etanol 96° 172 ml

II.2A.4 Acetato de Sodio 3M

Acetato de Sodio 40,81 g
H₂O 70 ml
Ajustar pH 5,2 con Acido Acético Glacial
Completar a 100ml con H₂O

II.2A.5 Fenol estabilizado

Fundir 250 gramos de fenol grado biología molecular, a baño maría
Agregar 0,1% 8-hydroxyquinoleina
Agregar 200 ml STE 2X

Agitar hasta emulsionar

Dejar decantar en frío, recuperar la fase acuosa y medir pH

Repetir el agregado de STE hasta alcanzar pH 8.0 en la fase acuosa

II.2B Purificación de DNA plasmídico

II.2B.1 Método lisis alcalina

II.2B.1.1 Solución I

Glucosa 50mM

Tris-ClH pH 8.0 25mM

EDTA pH 8.0 10mM

II.2B.1.2 Solución II

NaOH 0.2N

SDS 1%

Preparada antes de usar

II.2B.1.3 Solución III

60 ml Acetato de Potasio 5M

11.5 ml Acido Acético Glacial

28.5 ml H₂O

No autoclavar. Conservar a 4°

II.2B.2 Método columnas (Método Merlín)

II.2B.2.1 TE 50/10

50 mM Tris-ClH pH 7.5

20 mM EDTA pH 8.0

II.2B.2.2 TE_{10/1}

10 mM Tris-ClH pH 7.5

1 mM EDTA pH 8.0

II.2B.2.3 Solución de lisis

3 ml SDS 10%

1.2 ml HONa 5M

25.8 H₂O

II.2B.2.4 Acetato de Potasio 3M

Diluir 29.4 g de Acetato de Potasio en 40 ml de H₂O. Llevar a pH 4.8 con ácido acético glacial. Completar 100 ml con H₂O. Esterilizar por filtración.

II.2C DAS ELISA

II.2C.1 PBS-T

Diluir en 900 ml de H₂O 8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl, 0,5 g Tween 20. Ajustar volumen a 1000 ml con H₂O

II.2C.2 Buffer Coating

Diluir en 900 ml de H₂O 1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃, 0,2 g NaN₃. Ajustar volumen a 1000 ml con H₂O

II.2C.3 Buffer conjugado

Diluir en 100 ml de PBS-T 2 g PVP-40, 0,2 g albumina de suero bovina, 0,02 g NaN₃

II.2C.4 Buffer sustrato

Diluir en 800 ml de H₂O 97 ml Diethanolamine, 0,2 g NaN₃. Ajustar volumen a 1000 ml con H₂O

II.2D SDS-PAGE

II.2D.1 Acrylamida/BisAcrylamida (29:1)

14,6 g Acrylamida

0,4 g Bis acrylamida

Diluir en 50 ml de H₂O. Esterilizar por filtración

Mantener a 4°C en oscuridad

II.2D.2 Gel separación (14%)

2,5 ml Tris ClH 1,5 M pH 8,8

4,7 ml Acrylamida/Bis Acrylamida 30%

100 µl SDS 10%

2,7 ml H₂O

50 µl Persulfato de amonio 10% (preparado en el día)

5 µl TEMED

II.2D.3 Gel stacking (4%)

2,5 ml Tris ClH 0.5 M pH 6,8

1,3 ml Acrylamida/Bis 30%

100 µl SDS 10%

6,1 ml H₂O

50 µl Persulfato de amonio 10% (preparado en el día)

5 µl TEMED

II.2D.4 Buffer de electroforesis

Diluir en 1000 ml de H₂O 3 g Tris base, 14,4 g Glycine, 1 g SDS

II.2D.5 Solución de solubilización de proteínas (SSP)

1 ml Tris ClH 0.5 M pH 6,8

0,8 ml Glycerol

1,6 ml SDS 10%

0,01 g Bromophenol blue

4 ml H₂O

II.2E Western Blot

II.2E.1 Buffer de Transferencia

25 mM Tris

192 mM Glycina

20% Metanol

II.2E.2 Buffer conjugado

Diluir 2 g de leche descremada en 100 ml de PBS-T

II.2E.3 TBS-T

0,02 M Tris ClH pH 7,5

0,5 M ClNa

0,05 % Tween 20

II.2E.4 Buffer sustrato

0,1 M Tris ClH pH 9,5

0,5 mM Cl₂Mg

II.2E.5 Solución NBT

Disolver 30 mg Nitro blue tetrazolium chloride (Bio Rad, USA) en 1 ml de dimetil formamide 70%

II.2E.6 Solución BCIP

Disolver 1 pastilla de 5-bromo -4-chloro 3-indoyl phosphate p-toluidine (Sigma-Aldrich, USA) en 1 ml de dimetil formamide 100%

II.2E.7 Solución desarrolladora de color

Mezclar 10 ml de buffer sustrato con 100 µl de solución NBT y 100 µl de solución BCIP

II.2F Purificación de virus

II.2F.1 Buffer extracción closteros

0,5M Tris ClH pH 8,2

5% Triton X-100

4% Polyvinyl Poly Pirrolidone

0,5% Bentonita

0,2% β-Mercaptoetanol (agregar justo antes de usar)

II.2F.2 Colchón de sacarosa 20%

0,1M Tris ClH pH 8,2

20% sacarosa

II.2F.3 Buffer de resuspensión de pellets pH 8,2

0,02 M Tris ClH pH 8,2

1 mM MgCl₂

II.2F.4 Buffer de resuspensión de pellets pH 7,0

0,02 M Tris ClH pH 7,0

1 mM MgCl₂

II.2G Medios de cultivo para bacterias

II.2G.1 Medio LB

10 g Tryptone

5 g Extracto de levadura

5 g ClNa

Disolver en 800 ml de H₂O. Ajustar pH 7.0. Completar a 1000 ml.

Esterilizar por autoclavado.

II.2G.2 Placas LB+Amp

A 500 ml de medio LB, agregar 7,5 g de Agar. Esterilizar por autoclavado. Cuando el medio alcanza una temperatura de 50°C, agregar ampicilina a una concentración final de 100ug/ml. Plaquear en placas de petri de 90mm de diámetro.

II.2G.3 Placas LB+Amp+X-Gal

Una hora antes de usar las placas, distribuir sobre la superficie de una placa LB+Amp, 80 µl de X-Gal 2%.

II.2G.4 X-Gal 2%

Disolver 100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido en 5 ml de N-N dimetyl formamida. Mantener a -20°C hasta su uso.

II.2G.5 Medio SOC

2 g Tryptone

0,5 g Extracto de levadura

1ml ClNa 1M

0.25ml ClK 1M

Disolver en 90 ml de H₂O. Esterilizar por autoclavado. Agregar 100 µl de Glucosa 2M y 100ul Solución Mg²⁺ previamente esterilizados por filtración. Completar 100 ml con H₂O estéril

II.2G.6 Solución Mg²⁺

20,33 g Cl₂Mg.6H₂O

24,65 g SO₄Mg.7H₂O

Disolver en 100 ml H₂O. Esterilizar por filtración a través de filtro jeringa de 0,22 µm.

II.3 TÉCNICAS COMUNES A TODOS LOS CAPÍTULOS

II.3A Purificación dsRNA(Macro)

El protocolo utilizado es una adaptación de la técnica para extracción de dsRNA desarrollada por Valverde (1990). Se seleccionan brotes lignificados del año de plantas de vid. Se remueve la capa externa de ritidomis (tejido epidérmico muerto). Con ayuda de un bisturí, se remueven finas láminas de floema/cambium, y se muelen en mortero en presencia de nitrógeno líquido. El tejido se acumula en un vaso de precipitados mantenido en nitrógeno líquido, hasta alcanzar la totalidad de 40 g de tejido molido. Este tejido se homogeniza en un vaso de precipitados por agitación con buzo, 30 minutos a temperatura ambiente con 120 ml STE2X, 13,5 ml SDS 10%, 140 ml fenol estabilizado con STE2X, 140 ml Cloroformo y 700 µl β-Mercaptoetanol. El homogenato se centrifuga a 10.000 rpm durante 40 minutos a 4°C en un rotor Beckman Ty19 . Se separa la fase acuosa, a la cual se le ajusta el contenido de etanol a una concentración final de 16,5% con etanol 96° gota a gota. La fase acuosa se transfiere a una botella con 10 g de Cellulose Fibrous Media (Sigma-Aldrich, USA; equivalente a Celulosa CF11 Whatman) previamente sometida a tres lavados con 166 ml de STE1X-EtOH16,5%. La fase acuosa con los ácidos nucleicos se incuba en agitación con la celulosa por 30 minutos a 4°C. A continuación se carga una jeringa de 60 ml con un disco de miracloth en la base con la suspensión de celulosa. A medida que escurre la fase acuosa se repone el volumen con la suspensión, hasta cargar la totalidad en la jeringa. Una vez conformada la totalidad de la columna, se lava con 500 ml de STE1X-EtOH16,5%. Finalizado el lavado, se eluye con 4 volúmenes de 20 ml cada uno de STE1X, descartándose el primero de ellos

por ser el volumen muerto. Los tres volúmenes de elución restantes se combinan, se adiciona 0,1 volumen de Acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Se incuba a -20°C durante la noche y se centrifuga a 8.000 rpm a 4°C en un rotor F34-6-38 (Eppendorf) durante 40 minutos. Se descarta el sobrenadante, se secan los pellets al aire y se resuspenden en un total de 400 µl de STE 1X, se adiciona 0,1 volumen de Acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, se incuba un mínimo de tres horas a -20°C y se centrifuga a 10.000 rpm a 4°C en un rotor F-45-30-11 (Eppendorf) durante 40 minutos. El pellet resultante se lava con 500 µl de EtOH 70%, y tras secarlo al aire, se resuspende en 40 µl de STE 1X. Se almacena a -20°C hasta su utilización

II.3B Purificación dsRNA(Micro)

Esta técnica es una modificación de la descrita por Zang *et al.* (1998). Se utiliza el mismo tejido molido que en el caso anterior. En un microtubo de 2 ml se colectan 200 mg de tejido molido, los cuales se homogenizan por agitación 5 minutos en hielo, en 530 µl de STE2X, 620 µl Fenol, 620 µl de Cloroformo, 60 µl SDS 10% y 12ul β-Mercaptoetanol. A continuación, se centrifugan a máxima velocidad en un rotor F-45-30-11 (todas las centrifugaciones de esta técnica se realizan en el mismo rotor) 5 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa (aproximadamente 550 ul) se transfiere a un nuevo tubo, donde se agregan 50 mg de Cellulose Fibrous Media y 50 mg de Cellulose Microgranular (Sigma-Aldrich, USA), 110 µl Etanol 96° y 500 µl STE1X-EtOH16,5%. Los tubos se agitan en vortex durante 15 segundos, y se centrifugan a máxima velocidad durante 60 segundos a temperatura ambiente. Se descarta cuidadosamente el sobrenadante, y el pellet se lava con 1 ml de STE1X-EtOH16,5%, se agita en vortex 15 segundos y se centrifuga 60 segundos. Este lavado se repite tres veces. Después del último lavado, se seca el pellet de celulosa al aire 15 minutos, y se eluye dos veces con 200 µl de STE1X, se agita 15 segundos y se centrifuga 60 segundos. Se colectan los dos eluatos, se adiciona 0,1 volumen de Acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, se

incuba toda la noche a -20°C , y se centrifuga a 12.000 rpm 15 minutos a 4°C . El pellet se lava con 500 μl de etanol 70%, se deja secar al aire y se resuspende en 10 μl de STE1X. Se almacena a -20°C hasta su uso

II.3C Transcripción inversa (RT)

A partir del dsRNA obtenido ya sea por las micro o macro extracciones, se procedió a la generación de cDNA por retrotranscripción. Cinco microlitros de dsRNA fueron desnaturalizados a 99°C durante 5 minutos y enfriados inmediatamente en hielo. A esto se agregó 1 μl Hidróxido de Metil Mercurio 100mM (Alfa Aesar, USA) y 1 μl de random hexámeros 100 uM. La mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se colocó en hielo y se agregó 1 μl de β -Mercaptoetanol 700 mM (preparado fresco desde el stock 14M). Sobre esta mezcla de annealing se agregaron 4 μl de 5X Buffer RT (Fermentas, Canadá), 2 μl dNTP's 10mM, 1 μl inhibidor RNAsas RNaseOUT (Invitrogen, USA) y 200 U Transcriptasa Reversa de M-MLV (Fermentas), y se completó el volumen a 20 μl con H_2O . Los tubos se incubaron a 42°C por una hora, y posteriormente se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

II.3D RT-PCR

El cDNA obtenido por RT, fue amplificado por PCR. Para esto el resultante de la reacción de RT se diluyó 1:5 en H_2O . Un microlitro de esta dilución se combinó con 1 μl 10X Buffer PCR (Invitrogen), 0,4 μl cada uno de los dos primers 10uM, 0,3 μl dNTP's 10 mM, 0,5 μl Cl_2Mg 50mM, 0,25U Taq DNA Polymerase o Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) y H_2O en cantidad suficiente para 10 ul. Las reacciones fueron ensambladas en hielo, y de ser necesario fueron escaladas a un volumen final de 20 ul. Los programas correspondientes a cada par de primer se detallan en el anexo 1.

II.3E Colony PCR

Para realizar un screening complementario al blanco/azul por alfa-complementación usando X-Gal de las transformaciones, se realizó un screening por PCR. Para esto, mediante un escarbadiantes estéril, se

transfirió una porción de una colonia blanca a 10 µl de mix de PCR (1 µl 10X Buffer PCR [Invitrogen], 1 µl Buffer Cresol [20% sacarosa, 1mM Cresol Red, Merck, Alemania] 0,4 µl cada uno de los dos primers 10µM, 0,3 µl dNTP's 10 mM, 0,5 µl Cl₂Mg 50mM, 0,25U Taq DNA Polymerase [Invitrogen] y 6,35 µl H₂O), y a continuación se realizó una estría con la punta del escarbadiante sobre una nueva placa de petri con medio LB/Agar/Amp. Transferidas todas las colonias, la placa se incubó a 37°C al menos 6 horas. Los tubos o placas de 96 huecos para PCR fueron sometidos a PCR en un termociclador (Mastercycler, Mastercycler Personal o Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemania) con el programa adecuado para los primers a utilizar (detallado en el Anexo 1). Los productos de PCR fueron cargados directamente en un gel de agarosa sin la adición de buffer de carga (el Buffer Cresol actúa como Buffer de Carga)

II.3F PCR-RFLP

Los productos de PCR provenientes de RT-PCR o Colony PCR fueron restringidos para confirmar la ocurrencia de distintos aislamientos en una muestra (RT-PCR) o la identificación de colonias correspondientes a distintos aislamientos (Colony PCR). Para esto, las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 20 µl. A 10 µl de reacción, se le agregó 1 µl de seroalbúmina bovina acetilada a 10 mg/ml y 1 U de la enzima de restricción a utilizar (en caso de usarse mas de una enzima en la restricción, se utilizó 1 U de cada una) y se incubó a 37° una hora.

II.3G Purificación de DNA plasmídico (lisis alcalina)

Este método de alto rendimiento pero de baja calidad de ADN, provee plásmidos de calidad suficiente para subclonado pero no lo suficiente para secuenciación. La metodología fue descrita por Sambrook and Russell (2001). A partir de una colonia blanca identificada por screening blanco/azul mediante el uso de X-Gal, se inocula 3 ml de medio LB/Amp, y se cultiva en agitación a 37°C toda la noche. El cultivo saturado se transfiere a un tubo de microcentrifuga, y se centrifuga 1 minuto a maxima velocidad en un rotor F-45-30-11 (todas las centrifugaciones de esta técnica se realizan en el mismo

rotor) a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante, removiendo la totalidad del medio de cultivo presente con la ayuda de un tip conectado a una línea de vacío. El pellet se resuspende en 100 µl de Solución de Lisis I fría, y se vortexea hasta su total resuspensión. Se adicionan 200 µl de Solución de Lisis II y se mezcla el contenido del tubo por inversión 5 veces, colocando el tubo en hielo al finalizar. Se agregan 150 µl de Solución de Lisis III agitando vigorosamente el tubo, e incubando en hielo 5 minutos. El tubo se centrifuga a máxima velocidad 5 minutos a 4°C, y el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo. A este se agrega 1 ml de Etanol 96°, se incuba 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a máxima velocidad 5 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante, y el pellet resultante se lava con 1 ml de etanol 70%, se deja secar al aire y se resuspende en 50 µl de TE + 20 µg/ml RNase I.

II.3H Purificación de DNA plasmídico (método merlín)

Este método basado en columnas permite obtener plásmidos de muy alta pureza, para su secuenciación en secuenciadores de capilares. Es una adaptación del kit comercial Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA). A partir de una colonia blanca identificada por screening blanco/azul mediante el uso de X-Gal, se inocula 3 ml de medio LB/Amp, y se cultiva en agitación a 37°C toda la noche. El cultivo saturado se transfiere a un tubo de microcentrífuga, y se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad en un rotor F-45-30-11 (todas las centrifugaciones de esta técnica se realizan en el mismo rotor) a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante, removiendo la totalidad del medio de cultivo presente con la ayuda de un tip conectado a una línea de vacío. El pellet se resuspende en 200 µl TE_{50/10} + 20 µg/ml RNase I mediante vortexeo enérgico. Mientras se mantiene el tubo en hielo, se agregan 200 µl de Solución de Lisis, mezclando por inversión del tubo, e inmediatamente 200 µl de Acetato de Potasio 3M, agitando vigorosamente (no en vortex). El tubo se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad a 4°C, y el sobrenadante se combina con 1 ml de Resina Merlín, dejando reposar 1 minuto a temperatura ambiente. La mezcla se carga sobre

una minicolumna Wizard (Promega) adicionada de una jeringa de 3 ml y conectada a un manifold de vacío (Vac-Man, Promega) Mediante aplicación de vacío se filtra a través de la columna el homogenato y posteriormente la columna se lava con 2 ml de Buffer de Lavado. La columna se retira del manifold, y se coloca sobre un tubo nuevo para centrifugarla a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente. La columna se transfiere a un nuevo tubo y se carga con 50 µl de TE_{10/1} a 65°C para eluir. Se incuba 1 minuto a temperatura ambiente y se eluye por centrifugación a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.

II.3I DAS-ELISA

La metodología utilizada está basada en el protocolo desarrollado por Clark & Adams (1977). Aproximadamente 500 mg de tejido cortical de brotes lignificados fue molido en 10 volúmenes de Buffer de extracción de vid. El homogenato se almacenó a 4°C hasta su uso. En una placa de ELISA Nunc Maxisorp (Nunc, Dinamarca) se coloca en cada hueco 100 µl de Anticuerpo de captura correspondiente diluido 1:1000 en Buffer de Coating. La placa se coloca en cámara húmeda y se incuba 4 horas a 30°C. Finalizada esta incubación, se lava tres veces con PBS-T y se cargan 100 µl de muestra, por duplicado. En cada placa se colocan 2 controles positivos (provistos con el kit de ELISA u obtenidos a partir de una planta previamente identificada como ELISA positiva para el virus a analizar), 2 controles negativos (del mismo origen que los positivos) y dos blancos, en los que se carga solamente Buffer de Extracción de vid en esta etapa. La placa con las muestra se coloca nuevamente en cámara húmeda y se incuba toda la noche a 4°C. A continuación, se lava como en el paso anterior y se cargan 100 µl del correspondiente anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina diluido en Buffer Conjugado 1:1000. La placa se incuba nuevamente en cámara húmeda 5 horas a 30°C, se repiten los tres lavados con PBS-T y se agrega 100 µl de sustrato (1mg p-nitro fenil fosfato de sodio en 1ml Buffer Sustrato) por hueco. La placa se incuba en oscuridad, y se le realizan lecturas de absorbancia en un lector de placas de ELISA Titertek Multiskan MCC/340 (Labsystems,

Finlandia) a una longitud de onda de 405 nm a los 30, 60 y 120 minutos. Se consideran como positivos aquellas muestras que presentan un valor de absorbancia superiores al doble de los controles negativos.

II.3J Preparación de bacterias competentes

A partir de una colonia aislada fresca de la cepa de interés, se inocula 5 ml de medio LB y se cultiva toda la noche a 37°C en agitación. Este cultivo saturado, se utiliza para inocular 500 ml de medio LB. Se cultiva en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6. El cultivo se trasvasa a dos botellas de 250 ml y se enfría en hielo por 15 minutos y a continuación se centrifuga a 3.000 rpm en un rotor Ty19 durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspende suavemente en 12 ml de Cl_2Ca 0,1M frío, y se incuba 15 minutos en hielo. Se transfiere a un tubo de 50 ml y se centrifuga a 3000 rpm en un rotor F34-6-38 (Eppendorf) por 10 minutos, y se repite la última resuspensión y centrifugación en idénticas condiciones. El pellet finalmente se resuspende en 8ml de Cl_2Ca 0,1M + 15% glicerol, se dispensa en tubos plásticos 200 ul, y se almacena a -70° hasta su uso.

**Capítulo III: IDENTIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN PARCIAL DE
UN AMPELOVIRUS IDENTIFICADO EN VID EN ARGENTINA**

III.1 INTRODUCCIÓN

III.1A Ocurrencia de los ampelovirus del subgrupo I en el mundo

Como se mencionó en la introducción general, en los últimos 10 años se ha generado un importante volumen de información referido a la ocurrencia de supuestas especies virales pertenecientes a este subgrupo en plantas afectadas por LD (Martelli 2009). Esto contrasta con el subgrupo II, en el cual se ubican dos de las primeras especies en ser asociadas a la enfermedad, GLRaV-1 y GLRaV-3, sin haberse descrito ninguna nueva especie en 20 años, aunque los niveles de variabilidad genética de distintos aislamientos GLRaV-1 y GLRaV-3 son considerablemente altos (Kominek *et al.* 2005; Prosser *et al.* 2007).

La figura 3 muestra los países donde se ha registrado la presencia de al menos un ampelovirus del subgrupo I, y el año del primer informe. Como se puede ver, en casi todos los países vitícolas del mundo se ha identificado alguna de estas especies.

En estos trabajos se han utilizado diversas técnicas de diagnóstico: RT-PCR con primers específicos, con primers parcialmente degenerados, ELISA, western blot, microscopía electrónica conjugada con el uso de anticuerpos, etc.

III.1B Ocurrencia de virus asociados a LD en la Argentina

Los registros de ocurrencia de LD en la Argentina se remontan al año 1968 (Nadal 1968), pero no fue hasta la adopción de la técnica ELISA para el diagnóstico que se identifican en el país los virus GLRaV-1 y GLRaV-3 en plantas afectadas por LD. El establecimiento de un esquema sanitario de certificación de la vid en el país, permitió el análisis de un importante número de muestras, tanto sintomáticas como asintomáticas en distintas regiones productivas (Gracia *et al.* 1997). Aplicando la técnica de "indexing" (Gracia *et al.* 2003), determinaron en un primer momento, que la observación de síntomas

Identificación y secuenciación parcial de un ampelovirus identificado en vid en Argentina

es un buen filtro para descartar plantas enfermas con LD. Sobre 500 plantas analizadas en las zonas sur y norte de la provincia de Mendoza, se indentificó la ocurrencia de GLRaV-1 y GLRaV-3 con diferente distribución en ambas regiones productivas (respectivamente 28 y 5% en la zona sur, 9 y 14,4% en la zona norte). Los resultados positivos fueron obtenidos en plantas de variedades blancas o criollas, donde los síntomas de LD no son tan definidos como en tintas. Recién en el año 2003 se registra en la Argentina la ocurrencia de un tercer virus asociado a LD, en este caso GLRaV-2 (la única especie asociada a LD perteneciente al género *Closterovirus*), manifestando síntomas de incompatibilidad de injerto en cultivos implantados con material importado (Gómez Talquenca *et al.* 2003). En un reciente relevamiento realizado en Mendoza, se determinó que la incidencia de GLRaV-2 es notablemente mayor que la de los otros dos ampelovirus citados, como consecuencia del uso de material de propagación infectado (Lanza Volpe *et al.* 2010). En este último trabajo se mencionan en diversos viñedos, tasas de infección para GLRaV-1 y -3 de 0% a 5.2%

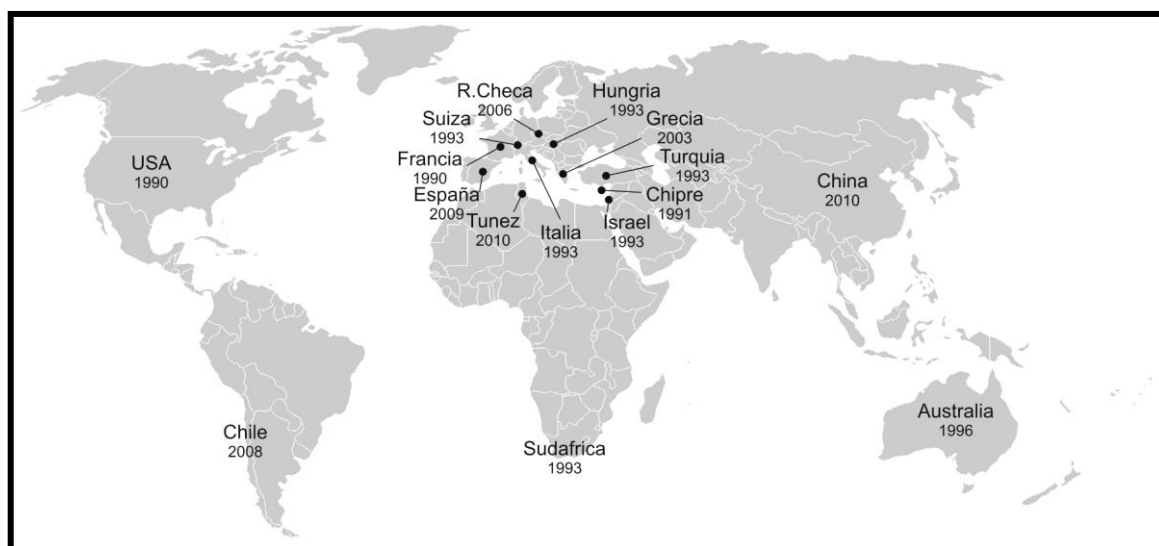


Figura 3. Países en los que se han reportado Ampelovirus del subgrupo I en vid, y año de la primera cita.

Hasta el momento no se ha detectado la ocurrencia de ninguno de los ampelovirus del subgrupo I, debido principalmente a la falta de métodos de diagnóstico adecuados para su relevamiento a campo.

III.1C Uso de ORF codificante para HSP70h como región válida para diagnóstico

Los primeros análisis genéticos de los closterovirus, mostraron la presencia de un ORF, conservado en todos los miembros, codificante para una proteína homóloga a la familia de proteínas de shock térmico celular presentes en organismos superiores (HSP70h) (Agranovsky *et al.* 1991). La presencia de dominios conservados en esta proteína permitió diseñar un primer par de primers (sobre los motivos A y E de la proteína) suficientemente amplios para lograr la amplificación mediante RT-PCR de un fragmento de aproximadamente 1Kb en diversos miembros del género. Posteriormente, y sobre los datos de secuencias generados para *Beet Yellow Virus* (BYV), *Beet Pseudo Yellow Virus* (BPYV), *Citrus Tristeza Virus* (CTV) (*Closterovirus*) y *Lettuce Infectious Yellow Virus* (LIYV) (*Crinivirus*), Tian *et al* (1996) identificaron los dominios A y C de la HSP70h (correspondientes a los motivos de fosfatasa 1 y 2) como muy conservados entre estos virus que están distantemente relacionados. El diseño de primers degenerados sobre esta región, permitió la amplificación exitosa de un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases de todas las especies virales analizadas. Estos mismos primers fueron utilizados posteriormente para lograr la amplificación del fragmento correspondiente de GLRaV-4 y 5, permitiendo conocer por primera vez parte del genoma de estas especies (Routh *et al.* 1998). El uso de estos primers, o de otros primers diseñados mediante distintas metodologías, pero siempre sobre los dos motivos de fosfatasa (Dovas and Katis 2003), permitieron, en un primer momento diagnosticar, y posteriormente generar datos de secuencia, de virus que hasta entonces eran poco caracterizados pertenecientes al subgrupo I de los

Ampelovirus (Good and Monis 2001; Alkowni *et al.* 2004; Saldarelli *et al.* 2006; Maliogka *et al.* 2008b).

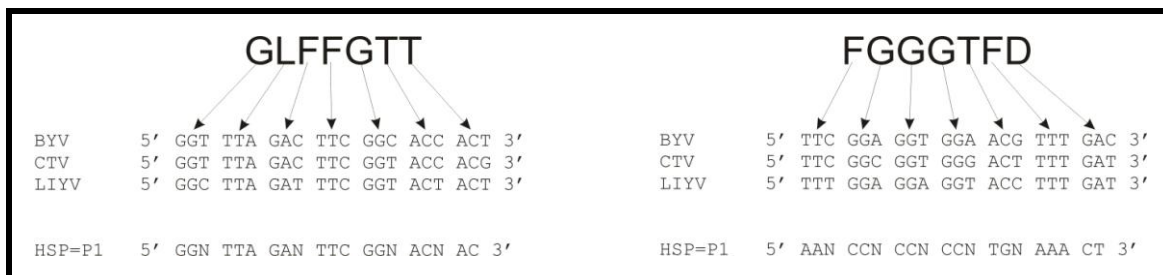


Figura 4. Ubicación de los primers HSP-P1/2 diseñados por Tian *et al* sobre los dominios 1 y 2 de la fosfatasa de la HSP70h

III.1D Uso de primers degenerados para amplificación de secuencias distantemente relacionadas

El uso de primers degenerados para amplificación de secuencias distantes conlleva algunos inconvenientes. En términos generales, se utilizan dos estrategias para el diseño de primers degenerados. Tal vez la más utilizada, consiste en realizar un alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de interés, y sobre esto, identificar una “ventana” del tamaño del primer (generalmente 20-30 nucleótidos) con alto nivel de conservación, y sobre ésta diseñar un primer con posiciones degeneradas de manera de abarcar la mayoría, sino todas, las secuencias involucradas. Esta es la metodología utilizada por Tian *et al* (1996). El problema de esta técnica reside en que al intentar diseñar primers para secuencias distantes, la degeneración puede llegar a ser demasiado alta, lo que conlleva que el número de primers efectivamente complementarios a la secuencia a amplificar sea muy bajo. Esto último, conjugado con las condiciones de baja astringencia de las reacciones de PCR utilizadas para estos primers, genera productos de PCR con muy baja intensidad, o un importante número de productos no específicos. Una segunda estrategia consiste en el diseño de un solo primer generado a partir de la secuencia consenso del alineamiento (esto es, la secuencia derivada de los nucleótidos más frecuentes en cada posición).

Esta técnica es muy útil en el caso de genes muy conservados, pero pierde funcionalidad al tratar de cubrir secuencias distantemente relacionadas.

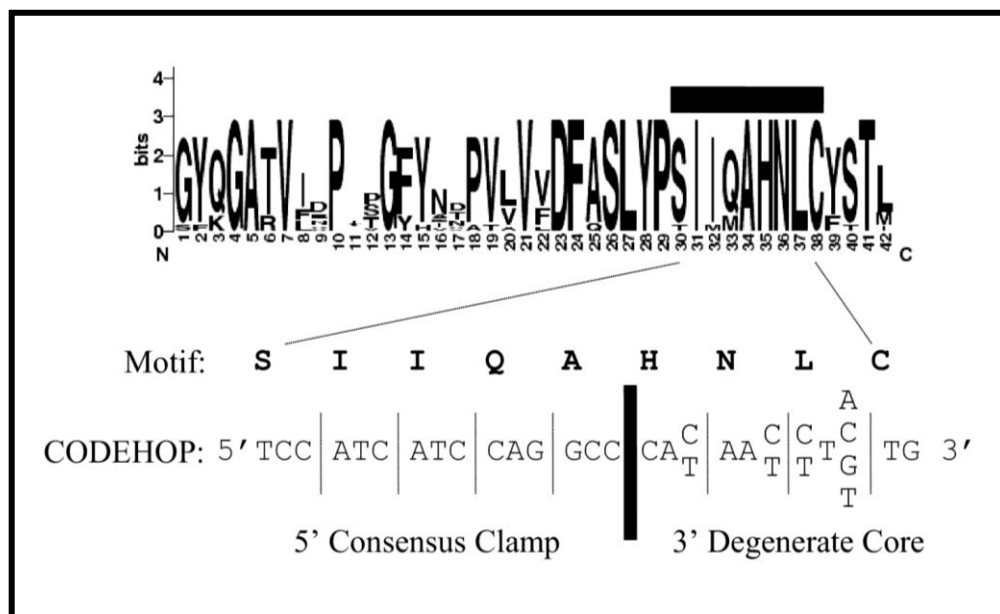


Figura 5. Modelo de selección de primers con el algoritmo CODEHOP. A partir del bloque "SIIQAHNLC", diseña un primer con una parte derivada de los codones mas frecuentemente usados para codificar ese aminoácido (extremo 5', Consensus clamp), y otra parte degenerada que cubre todos los posibles codones que codifican para los correspondientes aminoácidos (extremo 3', Degenerate Core). Reproducido de (Rose et al. 2003)

Distintas estrategias y algoritmos han sido desarrollados para tratar de solucionar los problemas encontrados al intentar amplificar por PCR genes homólogos de organismos con distinto grado de relación. Una de estas estrategias, es el diseño de primers parcialmente degenerados a partir de pequeños bloques conservados de proteínas. El método CODEHOP (Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) combina parcialmente las dos estrategias de diseño de primers degenerados enunciadas anteriormente (Rose et al. 1998). A partir de la identificación de bloques de secuencias proteicas altamente conservadas entre especies de una misma familia de genes, se genera un primer híbrido, en el cual el

extremo degenerado 3' se desarrolla a partir de todos los posibles codones correspondientes a una porción del bloque de proteínas, y el extremo 5' se genera a partir de los codones más frecuentemente usados para codificar los aminoácidos del resto del bloque.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

III.2A Material vegetal y aislamientos virales utilizados.

Para el ajuste de las condiciones de reacción de los primers diseñados para closterovirus, se utilizaron 3 aislamientos de vid infectados con GLRaV-1 (Pinot Gris), GLRaV-2 (Cabernet Sauvignon) y GLRaV-3 (Chardonnay) La presencia de estos virus como infección única fue confirmado por DAS-ELISA y RT-PCR para cada uno de los tres virus. Como control negativo se utilizó en todos los casos una accesión de Chardonnay libre de virus obtenido del ENTAV (Etablissement National Technique pour l'Amélioration de la Viticulture), Le Grau du Roi, Francia. Se utilizaron dos especies de closterovirides distantes para validar los primers a utilizar: el aislamiento de campo de *Citrus Tristeza Virus* (CTV) C-268-2 se obtuvo de la colección de aislamientos del IBBM en forma de dsRNA, y un tejido de batata infectada con un crinivirus relacionado a *Sweet Potato Chlorotic Stunt Virus* (SPCSV), que fue gentilmente cedido por la Dra Claudia Nome (IPAVE-CIAP-INTA)(Nome *et al.* 2007).

Una accesión del cv. Red Globe mantenida en el Laboratorio de Fitovirología de la EEA Mendoza fue utilizada para la caracterización del aislamiento de ampelovirus presente en ella. Esta planta fue seleccionada en un relevamiento previo por presentar indicios de infección con un miembro de la familia *Closteroviridae* adicional a GLRaV-1, -2 o -3(Gomez Talquenca *et al.* 2003). Esta planta no presentaba síntomas típicos de LD, salvo un leve

mosaico violacéo, correspondiente a la severidad 1 de la escala utilizada (Anexo 2).

III.2B Diseño de primers para Closterovirides

III.2B.1 Selección de secuencias y generación de bloques conservados

Se realizó una selección de las secuencias disponibles en la base de datos para el diseño de los primers parcialmente degenerados a utilizar para la identificación de potencialmente nuevas especies de miembros de la familia *Closteroviridae* en vid. Las secuencias seleccionadas se detallan en la Tabla.IV

Tabla IV. Secuencias utilizadas para el diseño de primers para HSP70h mediante CODEHOP

Accesion Genpept	Especie	Género	Tamaño
CAC83741	ApSPV	<i>Ampelovirus</i>	196 aa
AAK38612	GLRaV-1	<i>Ampelovirus</i>	460 aa
AAC40708	GLRaV-3	<i>Ampelovirus</i>	549 aa
AAB96680	GLRaV-4	<i>Ampelovirus</i>	197 aa
AAK38608	GLRaV-5	<i>Ampelovirus</i>	530 aa
YP_001642339	PMWaV-1	<i>Ampelovirus</i>	509 aa
AF283103_4	PMWaV-2	<i>Ampelovirus</i>	541 aa
AAC25117	BYV	<i>Closterovirus</i>	598 aa
2113437E	CTV	<i>Closterovirus</i>	594 aa
CAA74563	GLRaV-2	<i>Closterovirus</i>	599 aa
CAB65319	OLYV	<i>Closterovirus</i>	203 aa
CAA75919	GLRaV-7	No asignado	196 aa
NP_045004	LChV-1	No asignado	618 aa

Las secuencias seleccionadas fueron alineadas con el programa ClustalW. A partir del alineamiento múltiple obtenido, se definieron bloques de secuencias conservadas utilizando el programa BlockMaker. Estos bloques fueron posteriormente utilizados para diseñar primers parcialmente degenerados.

III.2B.2 Diseño de primers para los dominios I y II de la fosfatasa de la HSP70h

A partir de los bloques de secuencias de aminoácidos identificados en el alineamiento múltiple de las HSP70h de los aislamientos considerados, se utilizó el programa CODEHOP disponible en <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html> (Rose *et al.* 1998), con todos los parámetros por defecto, excepto la tabla de uso de codones, utilizándose la tabla de Grapevine leafroll associated virus 2.

Los primers obtenidos fueron apareados en todas las combinaciones (sentido y antisentido) y confrontados mediante el programa PRIMERSEARCH del paquete informático EMBOSS contra todas las secuencias disponibles en la base de datos de Genbank correspondientes a la HSP70h de miembros de la familia Closteroviridae, con niveles de mismatch de 0, 5, 10 y 20%. Se seleccionaron para la síntesis los primers con mayor número de aciertos sobre las secuencias disponibles en la base de datos para el análisis.

III.2C Puesta a punto de condiciones de amplificación de primers CODEHOP

El par de primers seleccionado tras el diseño mediante CODEHOP fue CHP-S (GGT TTC GAT TTY GGN ACN AC) y CHP-A (GGA AGT ACC ACC NCC NAR RTC) (Figura 8) fue comparado con los primers diseñados por Tian *et al.* (1996) según las condiciones reportadas por Saldarelli *et al.* (1998). Para la amplificación se utilizó cDNA generado a partir de dsRNA como se describe en el capítulo 2. Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

III.2D Secuenciación parcial del genoma de un ampelovirus identificado en la variedad Red Globe

Para la secuenciación del genoma del ampelovirus presente en el cv. Red Globe, se utilizaron dos estrategias de clonación, basadas en RT-PCR.

III.2D.1 Clonación aleatoria de fragmentos de RNA viral

Para la clonación del genoma del ampelovirus presente en la variedad Red Globe, se utilizó en primer momento la metodología descrita por Fazeli *et al* (Fazeli *et al.* 1998). Brevemente, se genera cDNA a partir de dsRNA viral por transcripción inversa, utilizando el primer P1-N6. Este cDNA contiene en su extremo 5' la secuencia P1, y en su extremo 3' la secuencia P1-complementaria. Después de purificar este cDNA para eliminar los restos de P1-N6, se somete a amplificación por PCR utilizando el primer P1 (Figura 6). En esta reacción se generan fragmentos de tamaño variable, los cuales son clonados en el vector pGEM T easy.

Las colonias blancas obtenidas son evaluadas por colony-PCR, y aquellas con insertos mayores a 300 pares de bases, seleccionadas para extracción de ADN plasmídico, y en los plásmidos obtenidos se confirma la presencia del inserto por restricción con EcoRI.

Los plásmidos seleccionados son secuenciados en los dos sentidos como se describe más adelante.

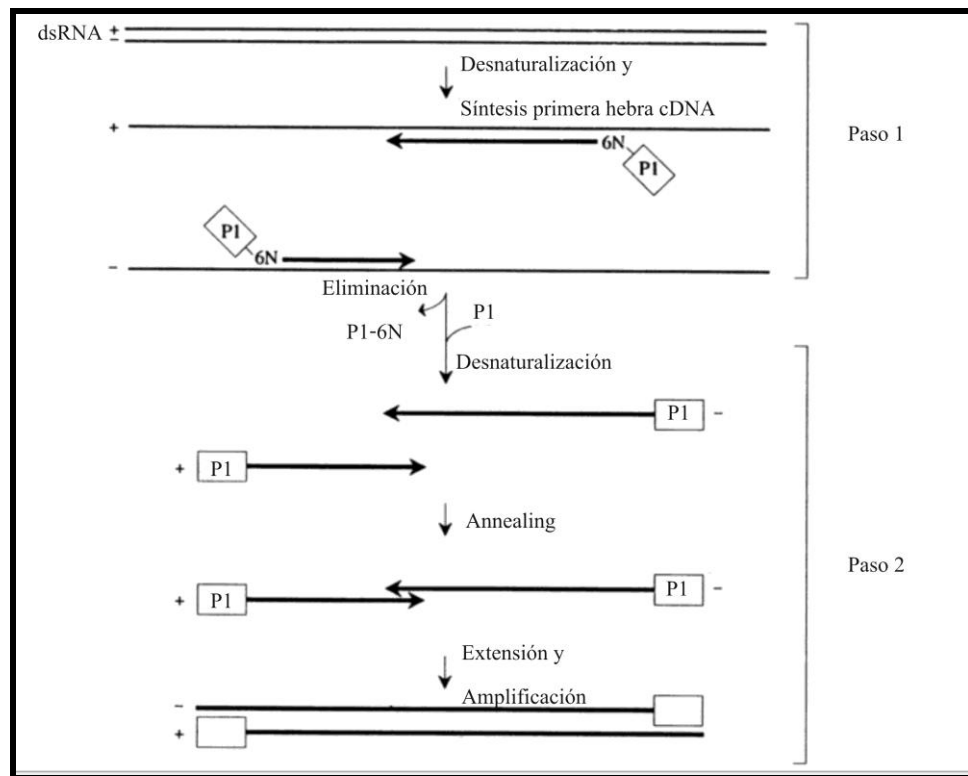


Figura 6. Proceso de amplificación de fragmentos aleatorios por PCR. Traducido de Fazeli et al (1998)

III.2D.2 Clonación basada en PCR específica

Complementario al método descrito arriba, se clonaron y amplificaron fragmentos del genoma del ampelovirus identificado mediante PCR específica. Los primers utilizados, y su posición estimada en los genomas de GLRaV-5 y GLRaV-9 se muestran en la figura 7. Los primers iniciales fueron los descritos por Good and Monis (2001) para la CP (LR-5-S/A) y los CHP-S/A descritos anteriormente para amplificar parcialmente la HSP70h. Los pares de primers restantes (SL-S/C-HSP90 y C-HSP91/C-CP) fueron diseñados sobre las secuencias generadas en este trabajo utilizando el programa Primer3!

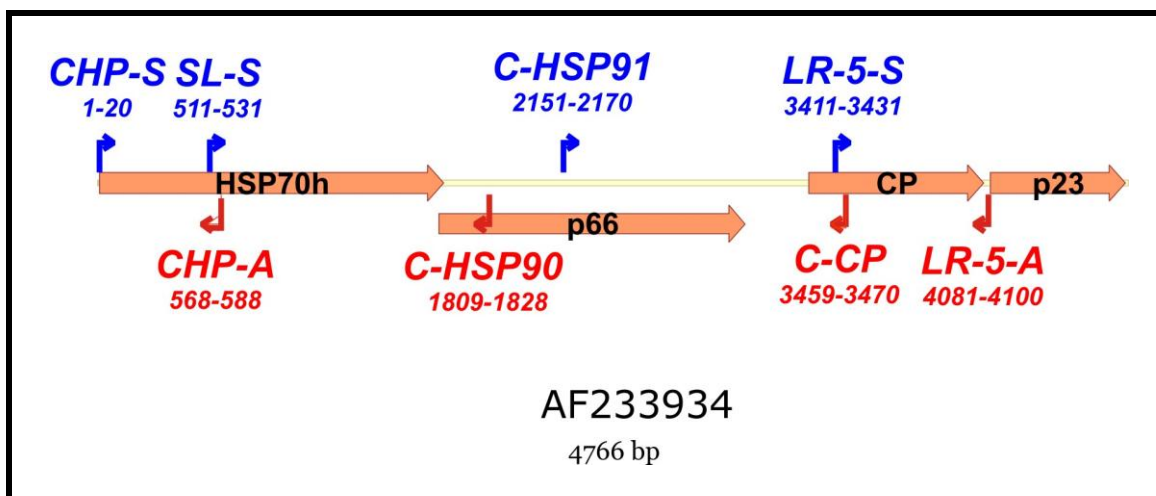


Figura 7. Posición de los primers utilizados sobre el genoma de la secuencia de referencia de GLRaV-5

Las condiciones de reacción de cada par de primers se describen en el anexo 1 correspondientes. El cDNA utilizado se obtuvo a partir de dsRNA como se describe en el capítulo 2. Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, fueron clonados y estos clones evaluados como se describe arriba.

III.2D.3 Análisis de secuencias

Los clones seleccionados fueron secuenciados en un analizador genético ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Los archivos resultantes fueron interpretados con el software Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems). Las secuencias fasta obtenidas fueron sometidas al análisis con el programa PrimerSearch, del paquete informático EMBOSS, de manera de identificar cada uno de los primers específicos utilizados o la secuencia correspondiente al primer P1, y remover esta secuencia y la del vector. Las secuencias depuradas fueron ensambladas utilizando el programa Contig Express del paquete informático Vector NTI 8.

Sobre la secuencia total ensamblada, se identificaron los posibles ORF utilizando el programa GetORF del paquete EMBOSS. Las secuencias de

proteínas derivadas de estos ORF fueron alineadas con las proteínas homólogas de GLRaV-4, -5, -9, -De, -Pr, -Cyp y -Carn disponibles en las bases de datos con el programa ClustalW (Larkin *et al.* 2007), y este alineamiento se utilizó para construir las matrices de distancia de aminoácidos con el programa ProtDist.

III.3 RESULTADOS

III.3A Diseño de un par de primers parcialmente degenerados para la amplificación de la HSP70h de closterovirids

Después de realizar el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de los virus considerados, se pudieron identificar exitosamente y con un alto nivel de confianza, los dominios de fosfatasa 1 y 2 correspondiente a la HSP70h a través del programa Multiple alignment processor disponible en http://blocks.fhcrc.org/blocks/process_blocks.html. Estos bloques fueron utilizados para diseñar primers mediante el programa CODEHOP disponible en <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html> como se menciona anteriormente. Después de confrontar los primers generados por el programa, contra las secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos correspondientes a la HSP70h de miembros de la familia Closteroviridae mediante el programa Primersearch, se seleccionó y sintetizó el par CHP-S/A, por presentar menor número de mismatches (Figura 8).

En los cinco virus evaluados (GLRaV-1, -2, -3, CTV y SPCSV) se obtuvo un producto de amplificación definido del tamaño esperado (Figura 9). No se logró que los primers HSP-P1/2 (Tian *et al.* 1996) generaran un producto de PCR definido, observándose bandas espúreas y baja intensidad del amplicón objeto de la reacción.

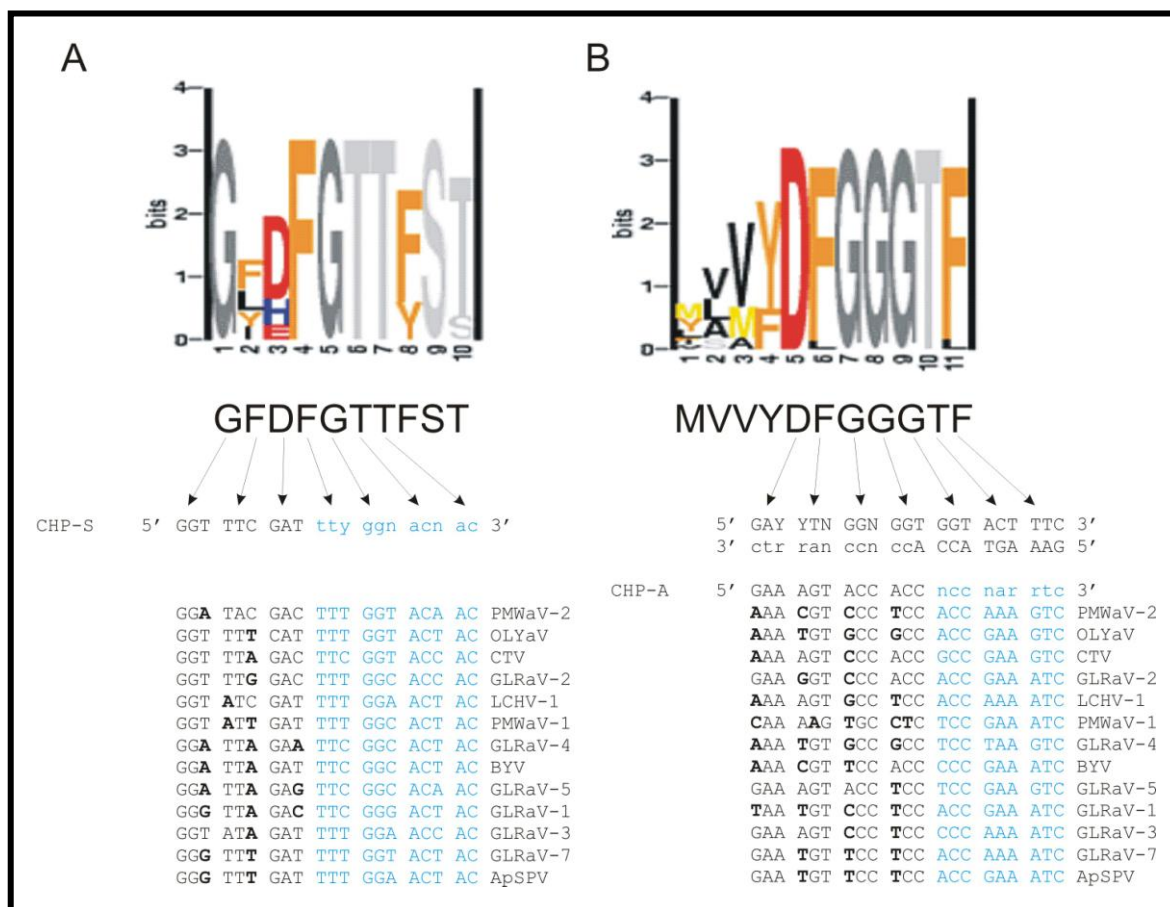


Figura 8. Diseño de primers para los dominios 1 (A) y 2 (B) de la fosfatasa de HSP70h, mediante el programa CODEHOP. Los motivos identificados se muestran con la representación gráfica LOGOS. Sobre los primers CHP-S/A, se muestra en azul la porción degenerada. En el alineamiento de las secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias utilizadas para la definición de los bloques, se resaltan las bases que difieren del consenso seleccionado por el programa

III.3B Secuenciación parcial del genoma de un Ampelovirus identificado en la variedad Red Globe

III.3B.1 Clonación mediante PCR no específica

El uso de la técnica descrita por Fazeli *et al* (1998), permitió obtener un producto de PCR consistente de un chorreado de entre 200 y 600 bp. El producto de PCR purificado y clonado, generó clones con insertos comprendidos entre esos tamaños. En total, 20 de estos clones fueron secuenciados en los dos sentidos, confirmándose en cada caso el tamaño del inserto esperado por los datos de secuenciación.

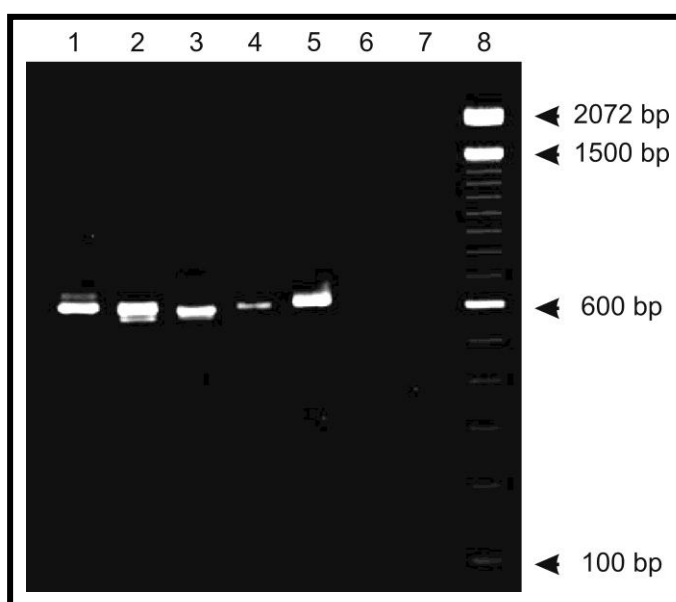


Figura 9. Amplificación por RT-PCR de la HSP70h de diversos *Closterovirides*, utilizando los primers CHP-S/A. 1) Pinot Gris infectado con GLRaV-1. 2) Cabernet Sauvignon infectado con GLRaV-2. 3) Chardonnay infectado con GLRaV-3. 4) Batata infectada con SPCSV. 5) CTV aislamiento C-268-2. 6) Chardonnay sano. 7) Agua. 8) Marcador de peso molecular 100 bp ladder (Invitrogen)

III.3B.2 Clonación mediante PCR específica

Los productos de PCR obtenidos a partir de los primers SL-S/C-HSP90, C-HSP91/C-CP y LR-5-S/A generaron productos del tamaño esperado en todos los casos (1.318, 1.326 y 690 pares de bases respectivamente). Los primers CHP-S/A generaron dos productos de PCR de 588 y 618 pares de bases, de acuerdo a los datos de secuenciación. Las

eficiencias de transformación fueron notablemente menores para los fragmentos de 1318 y 1326 pares de bases.

III.3B.3 Análisis de secuencias

En total se obtuvieron 20 secuencias provenientes de PCR no específica, y 12 secuencias provenientes de PCR específica (3 clones secuenciados por cada producto de PCR). En el caso de las secuencias provenientes de PCR no específica, fue notable la ocurrencia de secuencias no relacionadas con el ampelovirus buscado. Al estar la planta objeto de trabajo infectada con al menos *Rupestris Stem Pitting associated Virus* (RSPaV), GLRaV-2, GLRaV-2 raza RG y *Grapevine Virus A* (GVA), muchas de las secuencias obtenidas correspondieron a estos virus, o a rRNA proveniente de vid. La infección simultánea con GLRaV-2 fue la razón por la que se observaron productos de PCR correspondientes a los primers CHP-S/A de dos tamaños.

En todos los casos, las secuencias en ambos sentidos fueron ensambladas con el programa Contig Express del paquete informático Vector NTI 8 (InforMax Inc.) y sobre este alineamiento se identificaron y removieron las secuencias correspondientes a los primers utilizados en la reacción de PCR. Los insertos libres de secuencias foráneas, fueron confrontados mediante los programas Blastn y Blastx contra la base de datos de nucleótidos de NCBI para identificar su pertenencia.

III.3B.3.1 Secuencias obtenidas de PCR no específica

Sobre los 20 clones secuenciados, solo una secuencia mostró similitud con el genoma de ampelovirus presentes en la base de datos, mientras que 9 secuencias mostraron homología con GLRaV-2, 5 con RSPaV-1 y 5 con rRNA de vid. Estos resultados motivaron el cambio de estrategia de clonación hacia una basada en PCR específica. Después de la remoción de las secuencias perteneciente al vector del único clon con homología correspondiente a Ampelovirus del subgrupo I (clon P1-19), el inserto (471

nucleótidos) mostró alta identidad de secuencia con las posiciones aminoacídicas 77-218 de la p60 de GLRaV-5. La secuencia nucleotídica obtenida fue utilizada para diseñar los primers C-HSP90 y C-HSP91 utilizados en la clonación por PCR.

III.3B.3.2 Secuencias obtenidas por PCR específica

Considerando el alto número de clones correspondientes a otros virus obtenidos en la clonación desde PCR no específica, es que se cambió a una estrategia de clonación basada en PCR con primers específicos.

Considerando la alta homología de secuencia del clon P1-19 contra la secuencia de GLRaV-5 disponible en la base de datos (identidad aminoacídica del 97%), en conjunción al uso de los primers CHP-S/A dirigidos hacia la HSP70h de los miembros de la familia Closteroviridae en general, se utilizó el par LR-5-S/A dirigido a la CP de GLRaV-5, descrito por Good and Monis (Good and Monis 2001).

En el caso de la amplificación con los primers CHP-S/A, se secuenciaron inicialmente tres clones, los cuales mostraron diferencias de tamaño una vez removidos los primers (dos clones de 547 pares de bases y un clon de 577 pares de bases). Al comparar estos clones mediante Blastx con la base de datos de proteínas, los clones de 547 pb presentaron alta identidad de secuencia aminoacídica con la HSP70h de GLRaV-5, y el clon de 577 pb, alta identidad con GLRaV-2. Con el objeto de poder identificar los clones correspondientes a uno u otro virus, se identificó en la secuencia de 577 pares de bases, la presencia de tres sitios de reconocimiento para la enzima de restricción HinfI (G↓ANTC), los cuales estaban ausentes en la secuencia de 547. Esto permitió desarrollar una técnica de screening de colonias combinando PCR y restricción en un solo tubo (como se describe en el capítulo 2), que permitió diferenciar las dos secuencias en un gel por la presencia del fragmento de amplificación íntegro (fragmentos correspondientes a GLRaV-5) o digerido (correspondiente a GLRaV-2). De

esta manera se identificó un tercer clon correspondiente a la HSP70h de GLRaV-5. Sobre la secuencia consenso de los tres clones, se diseñó el primer SL-S, el cual conjuntamente con el primer C-HSP90, permitiría amplificar el fragmento entre HSP70h y el clon correspondiente a p60.

La reacción de PCR con los primers LR-5-S/A, produjo un fragmento del tamaño esperado de 690 pares de bases, resultando en un fragmento de 649 después de la remoción de los primers. Sobre la secuencia consenso de nucleótidos, se diseñó el primer C-CP, el cual conjuntamente con el primer C-HSP91, produce un producto de amplificación que cubre el espacio HSP90-CP.

La reacción de PCR con los primers SL-S/C-HSP90 y C-HSP91/C-CP, generó productos de amplificación en el rango de tamaños esperados (aproximadamente 1300 pares de bases), los cuales al ser clonados y secuenciados permitieron cubrir completamente la secuencia de interés.

III.3B.3.3 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas entre sí (secuencia directa y secuencia complementaria) y entre clones utilizando el programa Contig Express del paquete informático Vector NTI 8 (Informax Inc.). Sobre la secuencia total, se buscaron los posibles ORF con el programa GetORF del paquete EMBOSS, identificándose tres potenciales ORFs. Las tres secuencias de aminoácidos derivadas fueron comparadas con las secuencias homólogas de GLRaV-5, -9. -Carn, -Pr y -De, mediante alineamiento múltiple con el programa ClustalW. Los tres alineamientos múltiples fueron sometidos a un análisis para determinar distancias genéticas utilizando el programa Protdist, con un modelo de distancias basado en matriz de similitud.

Las tablas V, VI y VII presentan los valores de identidad de aminoácidos correspondientes a los tres ORF de los virus considerados.

En estas tablas se puede apreciar un alto nivel de similitud de secuencias entre todos los ampelovirus del subgrupo I, pero notablemente, la similitud de p60 entre el aislamiento identificado en la variedad Red Globe y el depositado en la base de datos es mucho menor de lo esperado considerando los niveles de identidad de HSP70h y CP (91% contra 96% para CP y HSP70h). Al analizar el alineamiento múltiple de proteínas, es destacable un alto nivel de identidad hasta una posición, a partir de la cual disminuye esta identidad, observándose también diferencias en el tamaño de la proteína codificada entre GLRaV-5 por un lado, y el aislamiento de Red Globe y el resto de los ampelovirus del subgrupo I por otro lado. Al realizar un alineamiento múltiple de nucleótidos en paralelo al alineamiento de proteínas, se pone de manifiesto que la posición T²⁸⁴⁴ de la accesión de GLRaV-5 depositada en la base de datos (AF233934), corresponde con una base no presente en GLRaV-9 ni en el aislamiento local de GLRaV-5. Para confirmar que esto no se tratara de un error de secuenciación, se diseñaron los primers GAP5-9-S/R, de manera de amplificar la región flanqueante a este nucleótido, cuyo producto de PCR fue clonado y secuenciado, confirmando la ausencia de este nucleótido en la secuencia de estudio. En consecuencia, para evaluar la hipótesis de un error en la secuenciación de la accesión AF233934, se editó la secuencia eliminando el nucleótido T²⁸⁴⁴ y traduciendo la proteína resultante del corrimiento del marco de lectura. En este caso, se obtuvo una proteína del mismo largo que las de GLRaV-5 y GLRaV-9, con solo un aminoácido de diferencia entre GLRaV-5 y GLRaV-5 RG (Figura 8). Esta corrección de la secuencia en la base de datos, eleva el nivel de identidad de aminoácidos de la p60 entre GLRaV-5 y GLRaV-5-RG de menos de un 80% a un 96%, mismo valor de similitud obtenido entre GLRaV-5RG y GLRaV-5 para los ORF codificantes para HSP70h y CP.

*Identificación y secuenciación parcial de un
ampelovirus identificado en vid en Argentina*

Tabla V. Identidad aminoacídica entre la secuencia de HSP70h del aislamiento presente en cv. Red Globe y las secuencias homologas de ampelovirus del subgrupo I

	GLRaV-5	GLRaV-9	GLRaV-Carn	GLRaV-Pr	GLRaV-De
GLRaV-5 RG	96%	87%	79%	79%	86%
GLRaV-5		87%	79%	79%	86%
GLRaV-9			79%	78%	86%
GLRaV-Carn				77%	76%
GLRaV-Pr					77%

Tabla VI. Identidad aminoacídica entre la secuencia de p60 del aislamiento presente en cv. Red Globe y las secuencias homologas de ampelovirus del subgrupo I

	GLRaV-5	GLRaV-9	GLRaV-Carn	GLRaV-Pr	GLRaV-De
GLRaV-5 RG	91%	83%	61%	69%	79%
GLRaV-5		80%	59%	65%	76%
GLRaV-9			65%	73%	84%
GLRaV-Carn				64%	63%
GLRaV-Pr					71%

Tabla VII. Identidad aminoacídica entre la secuencia de CP del aislamiento presente en cv. Red Globe y las secuencias homologas de ampelovirus del subgrupo I

	GLRaV-5	GLRaV-9	GLRaV-Carn	GLRaV-Pr	GLRaV-De
GLRaV-5 RG	96%	87%	79%	79%	86%
GLRaV-5		87%	79%	79%	86%
GLRaV-9			79%	78%	86%
GLRaV-Carn				77%	76%
GLRaV-Pr					77%

Identificación y secuenciación parcial de un ampelovirus identificado en vid en Argentina

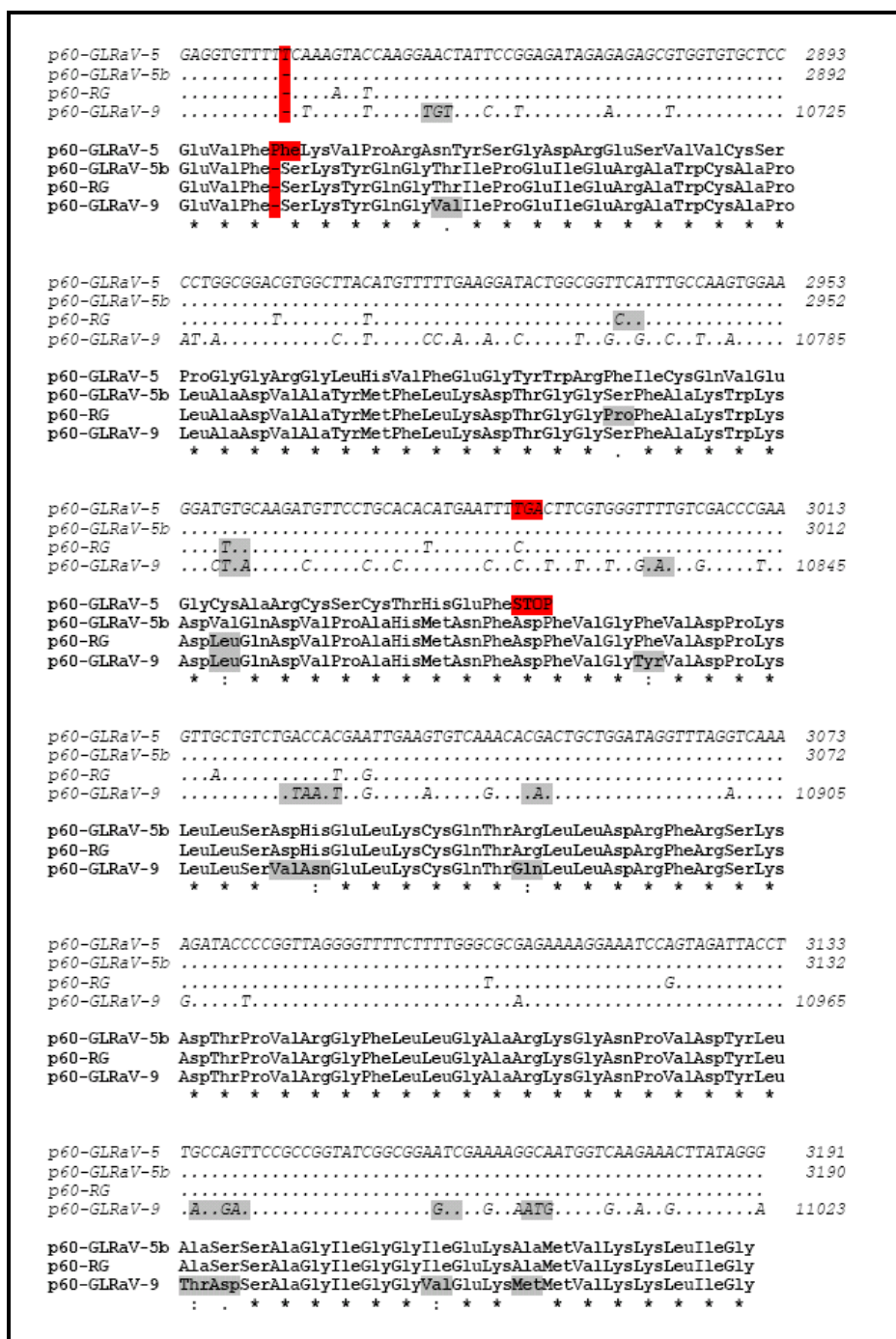


Figura 10. Alineamiento múltiple del extremo 3' de la secuencia de nucleótidos (cursiva) y la secuencia de aminoácidos deducida (negrita) del ORF codificante para p60 de GLRaV-5 (AF233934), la corrección propuesta de esta secuencia (GLRaV-5b), el aislamiento identificado en la variedad Red Globe y GLRaV-9. Sombreado en rojo se muestra la delección y su efecto. Sombreado en gris se muestran las sustituciones nucleotídicas no sinónimas y los cambios aminoacídicos derivados.

III.4 DISCUSIÓN

La secuenciación parcial del genoma del aislamiento viral identificado en la planta de la variedad Red Globe desarrollada en este trabajo, tuvo por objeto confirmar que el virus presente correspondía con una nueva especie viral no descrita previamente en el país, perteneciente al subgrupo I del género *Ampelovirus*. Hasta el momento solamente existía disponible en la base de datos de secuencia una sola accesión de GLRaV-5 que cubriera el fragmento secuenciado en este capítulo (Good and Monis 2001). Recientemente se ha publicado el genoma completo de un nuevo aislamiento de GLRaV-5 (Thompson *et al.* 2012).

Los datos obtenidos, permiten concluir que el aislamiento viral presente en el cultivar Red Globe es un miembro del subgrupo I de los ampelovirus. Considerando los tamaños de las proteínas deducidas de los ORF para p60 y CP del aislamiento identificado (GLRaV-5RG) y otros ampelovirus del subgrupo I, se observa que estas proteínas tienen un tamaño de 539 aminoácidos (534 para GLRaV-Carn) y entre 268 y 273 aminoácidos, para la p60 y CP respectivamente; comparado con 481-483 aminoácidos para p60 y 313-322 aminoácidos para CP en el caso de ampelovirus del subgrupo II (GLRaV-1 y GLRaV-3). Asimismo, los niveles de identidad entre las tres proteínas codificadas por los ORF secuenciados del aislamiento RG (96% de identidad) permiten asignarlo como GLRaV-5.

Capítulo IV: **CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA DE
AMPELOVIRUS DEL SUBGRUPO I**

IV.1 INTRODUCCIÓN

Si bien LD es una enfermedad difundida desde hace mucho tiempo, su etiología comenzó a esclarecerse recién en 1970, proceso que continúa hasta el presente. Inicialmente, se asociaron a la enfermedad distintos tipos de partículas virales: partículas isodiamétricas (Namba *et al.* 1979a; Castellano *et al.* 1983), partículas filamentosas cortas (700 nm) (Tanne *et al.* 1977), y partículas filamentosas largas (mayores a 1.600 nm) (Namba *et al.* 1979b). Recién en la década de 1980 comenzó a asociarse consistentemente, partículas filamentosas, características del entonces género *Closterovirus* con la enfermedad (Faoro *et al.* 1981; Gugerli *et al.* 1984; Milne *et al.* 1984). La optimización de protocolos de purificación de estas partículas filamentosas desde vid, permitió la obtención de antisueros específicos, lo que posibilitó el uso de la técnica de ELISA como diagnóstico (Gugerli *et al.* 1984). A partir de ese momento, comenzó una etapa en la que se lograron avances muy importantes, con el desarrollo de antisueros contra aislamientos con reactividad serológica diferencial, permitiendo suponer la existencia de al menos 7 especies virales diferentes (Boscia *et al.* 1995; Choueiri *et al.* 1996). Hacia fines de la década de 1990, una nueva era comenzó en la virología de la vid, con la incorporación de técnicas basadas en RT y PCR aplicadas al estudio de estos patógenos. Por la accesibilidad de estas técnicas y la robustez de los resultados obtenidos con ellas, las mismas fueron ampliamente usadas en los trabajos de investigación desarrollados desde entonces, en desmedro de las tradicionales técnicas serológicas (Figura 11). Gracias a esto, casi todas las especies asociadas a LD fueron parcialmente secuenciadas, y surgieron nuevas secuencias, que en base principalmente al grado de divergencia con las especies conocidas, fueron propuestas como nuevas especies (Tabla VIII).

Tabla VIII. Secuencias de CP de ampelovirus del subgrupo I asociados a LD depositadas en bases de datos con información sobre su reactividad serológica

Accesion GenPept	Especie	AS/Mab Homólogo	Reaccion Positiva	Reacción Negativa	Referencia
CAJ45361	GLRaV-4 Y252-IL	AS Y-252- IL	GLRaV-4	GLRaV-5 GLRaV-6	Saldarelli et al 2006
CAJ44239	GLRaV-4	AS Y253 TK	ND	GLRaV-4 GLRaV-5 GLRaV-6	Saldarelli et al 2006
AAK38610	GLRaV-5	AS Rec CP	ND	GLRaV-5	Good and Monis 2001
AAQ63812	GLRaV-9		ND	GLRaV-4 GLRaV-5 GLRaV-6	Alkowni et al 2004
YP_002364307	GLRaV-10 (Pr)	AS Rec CP	ND	GLRaV-5 GLRaV-6 GLRaV-9	Maliogka et al 2008
CAR91976	GLRaV-10 (Pr)		ND	GLRaV-5 GLRaV-6	Elbeiano et al 2009
CAO86171	GLRaV-11 (De)		ND	GLRaV-5 GLRaV-6 GLRaV-9	Maliogka et al 2008
ACT67480	GLRaV- Carn		ND	ND	Abou Ghanem Sabanadzovic et al 2010

Sin embargo, la información referida a la correlación entre datos de secuencia y datos serológicos, que permita clarificar estas relaciones, es escasa o ausente. Recientemente, diversos estudios filogenéticos han sido realizados sobre especies pertenecientes al subgrupo I de los ampelovirus asociados a LD (Alkowni *et al.* 2004; Maliogka *et al.* 2008a; Elbeiano *et al.* 2009; Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.* 2010), pero no hay información que permita asociar los grupos definidos con relaciones serológicas entre ellos. Actualmente, la comunidad de virólogos de vid (reunida en el ICVG), ha acordado limitar la proliferación de supuestas nuevas especies virales asociadas a LD, en base a datos de secuenciación solamente, y sustentar propuestas taxonómicas también con datos serológicos y/o biológicos (Martelli 2009).

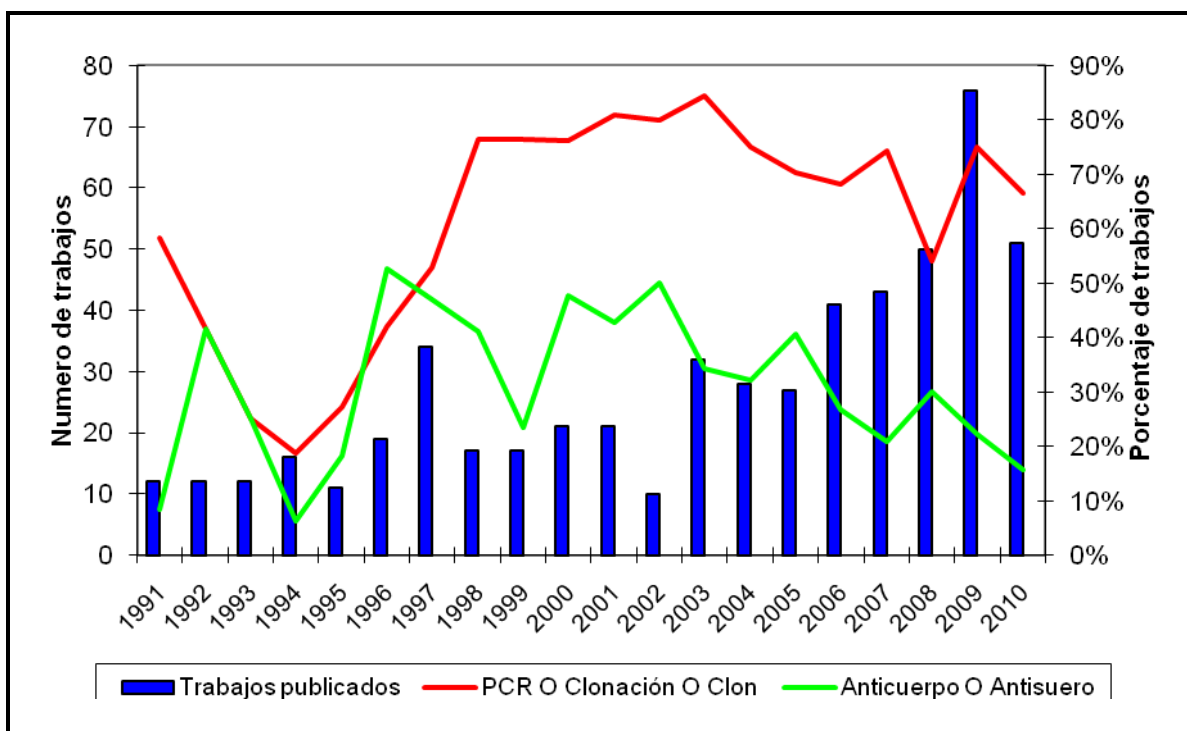


Figura 11. Evolución cronológica de la producción bibliográfica referida a LD. Las barras representan el número de trabajos publicados por año. La línea roja representa el porcentaje de esos trabajos basados en técnicas moleculares. La línea verde el porcentaje de trabajos con referencia a técnicas serológicas

IV.1A Serología de los ampelovirus del subgrupo I

En la tabla IX se resumen los antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales desarrollados contra ampelovirus del subgrupo I asociados a LD, y se presenta la reactividad con distintos aislamientos cuando la información está disponible. De esta tabla, se desprende que hay algunas supuestas especies que no han sido caracterizadas serológicamente (GLRaV-De por ejemplo). De la misma manera, hay anticuerpos monoclonales que presentan reactividad con especies virales distintas (Mab 15-5 por ejemplo), lo cual implica que los epítopes reconocidos por los mismos deberían ser muy conservados en el género, y podría esperarse un rango de detección aún mayor.

Tabla IX. Antisueros y anticuerpos desarrollados contra ampelovirus del subgrupo I asociados a LD y su especificidad

Especie	Antisero/Anticuerpo	Antígeno	Reacción Positiva	Reacción Negativa	Referencia
GLRaV-4	AS GLRaV-4	Thompson S.	GLRaV-4		(Hu <i>et al.</i> 1990b)
	Mab 3-1		GLRaV-4 GLRaV-9	GLRaV-6 GLRaV-5 GLRaV-9	(Besse <i>et al.</i> 2009)
	Mab 6-3	Thompson S.	GLRaV-4 GLRaV-5 GLRaV-6 GLRaV-9		(Besse <i>et al.</i> 2009)
	Mab 15-5		GLRaV-4 GLRaV-5 GLRaV-6 GLRaV-9		(Besse <i>et al.</i> 2009)
	AS Y-252-IL	Koudsi	GLRaV-4	GLRaV-5	(Saldarelli <i>et al.</i> 2006)
	AS Y253 TK	Koussan	GLRaV-4 -Y253	GLRaV-4 GLRaV-5 GLRaV-6 GLRaV-9	(Saldarelli <i>et al.</i> 2006)
	AS GLRaV-5	White Emperor		GLRaV-9 GLRaV-Cyp	(Zimmermann <i>et al.</i> 1990b)
GLRaV-5	Mab 43-1		GLRaV-5	GLRaV-4 GLRaV-6 GLRaV-9	(Besse <i>et al.</i> 2009)
	Mab 3-3	White Emperor	GLRaV-5 GLRaV-6	GLRaV-4 GLRaV-9	(Besse <i>et al.</i> 2009)
	Mab 8-2		GLRaV-5 GLRaV-6	GLRaV-4 GLRaV-6 GLRaV-9	(Besse <i>et al.</i> 2009)
GLRaV-6	Mab 36-117	Chasselas	GLRaV-6	GLRaV-4 GLRaV-5 GLRaV-9 GLRaV-Cyp	(Gugerli <i>et al.</i> 1997a)
GLRaV-9	AS GLRaV-9	Cabernet	GLRaV-9		(Gugerli <i>et al.</i> 2009)
	Mab 62-4	Sauvignon	GLRaV-9	GLRaV-4	(Gugerli <i>et al.</i> 2009)

Especie	Antisuero/Anti cuerpo	Antígeno	Reacción Positiva	Reacción Negativa	Referencia
	Mab 27-1		GLRaV-4 GLRaV-5 GLRaV-6 GLRaV-9		(Gugerli <i>et al.</i> 2009)
GLRaV-Pr	AS GLRaV-Pr	CP recombinante GLRaV-Prevezaniko	GLRaV-Pr	GLRaV-6 GLRaV-4 GLRaV-5 GLRaV-9 GLRaV-De	(Maliogka <i>et al.</i> 2009)

Por otro lado, los datos obtenidos mediante análisis serológicos en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, Western Blot) muestran que algunos anticuerpos monoclonales con buena reactividad contra partículas virales completas (en ELISA o ISEM) no reconocen la CP linearizada (Besse *et al.* 2009).

Pese a la gran cantidad de información disponible, ésta no está sistematizada y en muchos casos no hay datos de secuencias de aislamientos con conocida reactividad serológica, y viceversa.

De la tabla VIII se desprende que hay un vacío importante en la taxonomía de las supuestas especies virales. Las secuencias depositadas en la base de datos, no cuentan con un conjunto de información serológica respaldatoria de esa clasificación como nueva especie.

IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2A Material vegetal

La EEA Mendoza INTA posee la más importante colección ampelográfica de Sudamérica. En ella hay 670 accesiones correspondientes a distintas variedades, híbridos y especies afines a *Vitis vinífera*. Por la naturaleza de la procedencia del material, muchas de las accesiones se encuentran enfermas, y con una alta incidencia de síntomas visuales de

distintas virosis. Sobre esta colección se realizó un relevamiento de síntomas de LD, registrando la ocurrencia de síntomas y estableciendo la severidad de los mismos en una escala de 1 a 5 (5 más severo, Anexo 2). Se seleccionaron 143 plantas de 111 variedades diferentes con síntomas de la enfermedad, las que fueron analizadas por DAS-ELISA con reactivos comerciales contra GLRaV-1, -2, -3, -6, -7 y 4-9 (Bioreba AG, Suiza). Las plantas con reacción positiva para GLRaV-6 o 4-9 y las plantas negativas para todos los virus, fueron seleccionadas para los análisis subsiguientes. Adicionalmente se seleccionaron plantas sintomáticas provenientes de distintos viñedos del campo experimental de la EEA Mendoza con el mismo comportamiento serológico (plantas con síntomas de leafroll y positivas para GLRaV-6, 4-9, o negativas para todos los virus asociados a LD) y un conjunto de plantas consideradas en un estudio de variabilidad de GLRaV-2 conducido en paralelo, sospechosas de presentar infección múltiple con un ampelovirus (Lanza Volpe *et al.* 2009). La totalidad de plantas evaluadas se presentan en el Anexo 2.

IV.2B Purificación de virus

A partir de las muestras analizadas por DAS ELISA que presentaron reacción positiva contra anticuerpos para GLRaV-6 y GLRaV-4-9, se realizaron purificaciones de virus para evaluar su reactividad en Western Blot. El protocolo utilizado es una modificación del descrito por Savino (1993). De las estacas a procesar, se removió la capa externa de ritidomis (tejido epidérmico muerto) y se extrajo con bisturí el floema y cambium. Ochenta gramos de tejido cortical fueron molidos en mortero con nitrógeno líquido. El tejido molido se agregó a un vaso de precipitados con 500 ml de buffer de extracción para closteros frío. La mezcla se agitó en frío 20 minutos después de lo cual, se filtró el homogenato a través de una doble capa de gasa y se centrifugó 20 minutos a 4.000 rpm en rotor Ty19 (Beckman). El sobrenadante se transfirió a tubos de ultracentrífuga, y se colocó un colchón de sacarosa al 20% de 5 ml. Se centrifugó 90 minutos a 40.000 rpm en un rotor 55.2Ti

(Beckman). El sobrenadante se descartó cuidadosamente y se resuspendió el pellet obtenido en 10 ml de buffer de resuspensión de pellets pH 8.2. Se dejó reposar toda la noche en hielo. El precipitado fue resuspendido en un homogenizador de tejido de vidrio, después se agregó 1% de Triton X-100 y se agitó 30 minutos en hielo. La mezcla se clarificó por centrifugación 10 minutos a 10.000 rpm en rotor F34-6-38 (Eppendorf). El sobrenadante se transfirió a tubo de ultracentrífuga y se agregó 2.5ml de colchón de sacarosa 20%. Los tubos se centrifugaron 120 minutos a 35.000 rpm en rotor Ty50 (Beckman). El sobrenadante se descartó cuidadosamente y el precipitado se resuspendió en 800 µl de buffer de resuspensión pH 7.0, o el equivalente a la cantidad inicial de tejido utilizado (1/100 del peso inicial). Esto se dejó reposar toda la noche en hielo. Finalmente se homogeneizó en resuspendedor de pellets de vidrio. Las purificaciones fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

IV.2C SDS PAGE – Western blot

Los concentrados resultantes de la purificación fueron sometidas a Western blot. Quince microlitros de muestra (descongelada en hielo) fueron combinados con 15 µl de buffer de solubilización de proteínas, desnaturalizado durante 5 minutos a 100°C y enfriados en hielo. La mezcla se agitó en vortex previo a sembrar en el gel de poliacrilamida 14%/4%. Tres muestras fueron resueltas por cada minigel, sembradas en calles de 20 mm de ancho, y 5 µl de marcador de peso molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, Canadá) fue resuelto en una calle de 5 mm de ancho. Las muestras se resolvieron por 90 minutos a 100V en una cuba de electroforesis vertical MiniProtean II (BioRad, USA). Las proteínas resueltas en el gel fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (BioRad, USA) mediante una celda de electrotransferencia Mini Trans Blot (BioRad, USA), a 30V, en agitación durante toda la noche en presencia de buffer de transferencia, de acuerdo a las indicaciones del fabricante del equipo. Finalizada la transferencia, el casete de transferencia fue desarmado

cuidadosamente, y sobre la membrana adherida al gel, se identificó mediante pequeñas perforaciones, las ubicaciones de cada una de las calles correspondientes a las tres muestras y al marcador de peso molecular. El gel fue teñido por inmersión en Amido Black Staining Solution (Sigma-Aldrich, USA) para confirmar la elución de todas las proteínas resueltas. En la membrana se separó el fragmento correspondiente a la calle del marcador molecular, el cual fue teñido con Amido Black por 15 minutos en agitación, y después desteñido con 3 enjuagues en una solución 50% isopropanol + 10% ácido acético. La membrana con las muestras fue bloqueada mediante inmersión en buffer de bloqueo y agitación por 2 horas a 37°C. Después del bloqueo, se cortaron por cada una de las tres calles, 8 strips (aprox 3 mm de ancho), los cuales después de rotularlos, fueron incubados con cada uno de los 8 anticuerpos y antisueros detallados en las Tablas II y III, por 2 horas en agitación a 37°C. Pasada la incubación, las membranas fueron enjuagadas tres veces con PBS-T y tres veces con TBS-T, y posteriormente incubadas con el correspondiente anticuerpo secundario (Anti-Mouse AP conjugated o Anti-Rabbit AP Conjugated, Sigma-Aldrich, USA), en agitación durante una hora a 37°C. Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se lavaron los strips tres veces con PBS-T y tres veces con TBS-T, y se revelaron mediante inmersión en buffer de revelado, hasta la aparición de bandas definidas o tres horas. Las muestras fueron evaluadas dos veces en diferentes geles para confirmar los resultados.

IV.3 RESULTADOS

Sobre los 143 materiales analizados, 13 plantas no reaccionaron con ninguno de los anticuerpos utilizados. No se obtuvo ninguna reacción positiva a los anticuerpos contra GLRaV-7. Se registro una alta incidencia de infecciones mixtas con más de una especie viral. En la tabla X se presenta un resumen de los resultados, reflejando las plantas que reaccionaron con GLRaV-6, o GLRaV-4-9, evidenciando infección con un ampelovirus del subgrupo I. La totalidad de los resultados se presenta en el Anexo 2.

Tabla X. Muestras utilizadas para análisis de Western Blot, indicando su reactividad en ELISA.

Cultivar	Severidad Síntomas	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-6	GLRaV-7	GLRaV-4-9
Cabernet Sauvignon D33	3	-	-	-	+	-	+
Cabernet Sauvignon M1	3	-	-	-	+	-	+
Carmenere	2	-	-	-	+	-	+
Fosters white seedling	2	-	-	+	+	-	+
Lanjaron Claro	3	-	-	-	+	-	+
Syrah 805	2	-	-	-	+	-	+
Colgadera	2	+	-	-	-	-	+
Aspirant Bouchet	5	-	+	-	+	-	-
Masse Camp	4	-	+	+	-	-	+
Sacy	3	-	-	-	-	-	+
Plavai	2	-	+	-	-	-	+
Shuyler	2	-	+	-	-	-	+
Siangiovese Fiano	3	-	+	-	-	-	+
Tamares	3	-	-	+	-	-	+
Tockai Friulano	2	-	+	+	-	-	+
Cabernet Sauvignon LR50	5	-	-	-	-	-	+

IV.3A Western Blot

La eficiencia de transferencia fue muy buena, al no observarse ninguna banda remanente en los geles de poliacrilamida que fueron teñidos post-transferencia. En el análisis de las membranas, se consideró como positivo la ocurrencia de una banda de un tamaño aproximado de 36 KDa, bastante por encima del peso molecular estimado de la CP de los ampelovirus del subgrupo I de 29 KDa. Esta diferencia entre los pesos estimados a partir de la secuencia aminoacídica y los pesos observados en Western Blot ha sido reportada previamente (Rigotti *et al.* 2006; Saldarelli *et al.* 2006) Los tres antisueros policlonales evaluados (AS GLRaV-5, AS GLRaV-6 y AS-Y-252-IL) mostraron reactividad con un polipéptido del tamaño esperado en todas las muestras positivas por ELISA. A su vez, los antisueros AS-

GLRaV-5 y AS-Y-252-IL mostraron una baja especificidad, reconociendo proteínas de diverso peso molecular tanto en extractos de plantas infectadas con distintos aislamientos de GLRaV, como en el control sano utilizado (Figura 12 A).

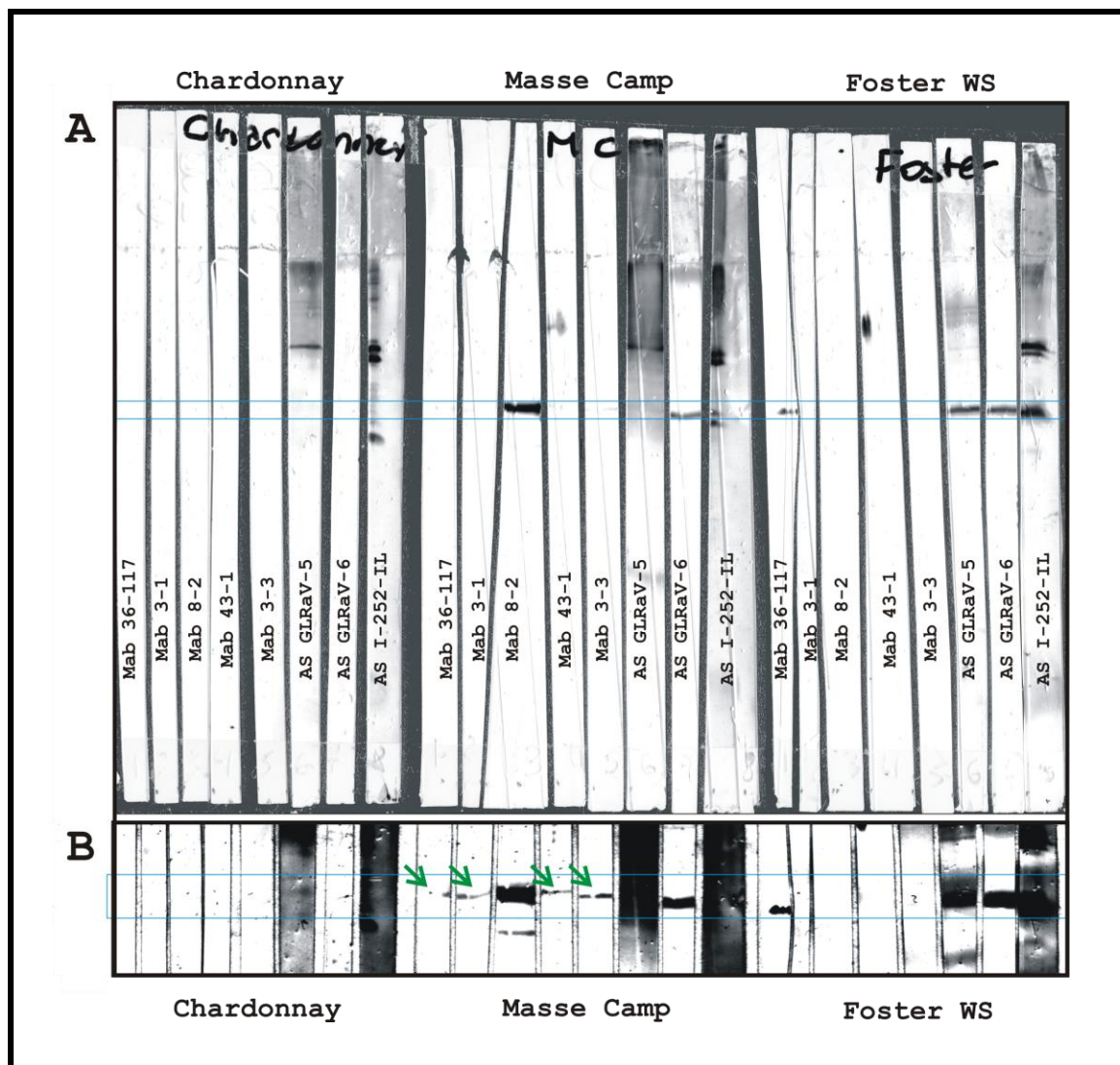


Figura 12. Membrana de nitrocelulosa revelada. En el recuadro azul se indica el rango donde se espera observar las bandas esperadas A) Reacción de tres muestras a los 5 anticuerpos monoclonales y tres antisueros policlonales. Se puede observar en la muestra Chardonnay (control sano) las bandas no específicas en los AS GLRaV-5 e I-252-IL, presentes en las tres muestras. B) Detalle de la membrana con contraste mejorado. En la muestra Masse Camp se pueden observar bandas tenues del tamaño esperado con los 4 anticuerpos monoclonales (indicados por flechas verdes)

Las intensidades de las bandas identificadas por los distintos antisueros y anticuerpos fue muy variable (Figura 12 B), por lo que se consideraron como con reacción positiva contra un anticuerpo las que presentaron una banda muy tenue del tamaño adecuado. Ninguna de las muestras analizadas presentó reacción positiva neta con el anticuerpo Mab 3-1, salvo 4 muestras (Syrah 805, Cabernet Sauvignon M1, Masse Camp y Plavai) las cuales presentaron una reacción cruzada muy débil con este y otros anticuerpos monoclonales. El anticuerpo Mab 3-1 ha sido reportado como específico contra GLRaV-4, sin reacción cruzada contra GLRaV-5 o -6 (Gugerli 2009). Dos muestras reaccionaron con los tres antisueros policlonales pero con ningún monoclonal. Una muestra (Sangiovesse Fiano) mostró solamente reacción débil con ASY253-IL. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla XI.

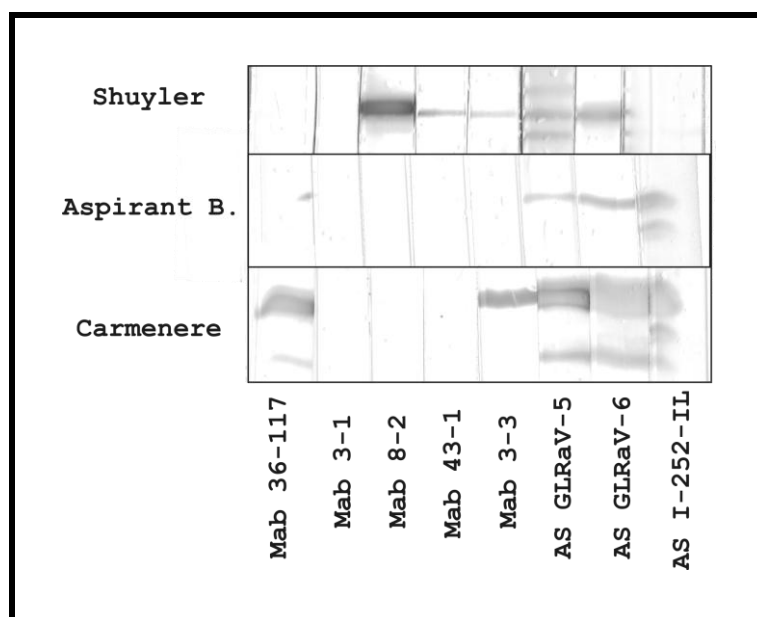


Figura 13. Membranas de nitrocelulosa reveladas correspondientes a tres muestras con nítidos comportamientos diferenciales frente a los anticuerpos y antisueros utilizados.

Tabla XI. Reactividad de las muestras analizadas en Western Blot. "t": banda tenue

Variedad	Mab36-117	Mab3-1	Mab8-2	Mab43-1	Mab3-3	AS GLRaV-5	AS GLRaV-5	AS I-252-IL	Especie probable basada en reacción serológica	
Lanjaron	+	-	-	-	-	+	+	+	GLRaV-6	
Aspirant B	+	-	-	-	t	+	+	+		
Cabernet Sauvignon M1	+	t	-	-	t	+	+	+		
Foster WS	+	-	-	-	t	+	+	+		
Cabernet Sauvignon D33	+	-	-	-	+	+	+	+		
Carmere	+	-	-	-	+	+	+	+		
Plavai	+	t	t	t	+	+	+	+		
Sacy	+	-	-	-	+	+	+	+		
Syrah 805	+	t	t	t	+	+	+	+		
Masse Camp	t	t	+	t	t	+	+	+		
Cabernet Sauvignon LR50	-	-	+	-	-	+	+	+		GLRaV-5
Colgadera	-	-	+	-	-	+	+	+		
Shuyler	-	-	+	+	+	+	+	+		
Chardonnay	-	-	-	-	-	-	-	-	Sano	
Sangiovesse F	-	-	-	-	-	-	-	t	GLRaV-9?	
Tamares	-	-	-	-	-	+	+	+	GLRaV-4/5/9?	
Tockai	-	-	-	-	-	+	+	+		

IV.4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos sobre el conjunto de muestras seleccionadas, ponen de manifiesto una incidencia destacable de los virus del subgrupo I de ampelovirus asociados a la enfermedad de leafroll en Mendoza. Hasta el momento, los únicos datos de ocurrencia de virus asociados a leafroll, se obtenían de relevamientos que consideraron solamente GLRaV-1 y -3 (Gracia *et al.* 1997) y GLRaV-1,-2 y-3 (Lanza Volpe *et al.* 2010). El hecho de que el 20% de las plantas presenten infección con un ampelovirus del subgrupo I, pone de manifiesto la necesidad de considerar

este conjunto de virus, un actor importante en la etiología de la enfermedad leafroll en Argentina.

Los resultados de ELISA, además de poner de manifiesto la alta ocurrencia de infecciones mixtas con distintas especies, que es común en vid, también ponen en evidencia que no hay un set de diagnóstico único disponible, ya que 1 muestra no fue detectada por el kit genérico y si por el kit anti GLRaV-6.

Con respecto a los resultados de Western Blot, si bien a partir de un número considerable de muestras no se pudo lograr una purificación adecuada para WB (principalmente debido a la falta de tejido para procesar por el escaso desarrollo de las plantas, resultando bajos volúmenes de purificado para realizar todas las réplicas), las muestras analizadas presentaron una elevada reactividad cruzada entre varios anticuerpos monoclonales (Tabla XI). Considerando los anticuerpos contra GLRaV-5 (Mab43-1, Mab8-2 y Mab3-3) y contra GLRaV-6 Mab36-117) se podría realizar una asignación tentativa de las muestras a estas especies. Según Gugerli (2009), Mab43-1 y Mab36-117 son los anticuerpos más específicos contra GLRaV-5 y GLRaV-6 respectivamente, mientras que Mab8-3 y Mab 3-3 si bien desarrollados a partir de un antígeno tipificado como GLRaV-5 presentan reacción cruzada con GLRaV-6. De este modo, podría asignarse como GLRaV-5 el grupo de muestras con reacción clara frente a Mab 43-1(4 muestras). Tres muestras estarían quedando fuera de esta asignación (Sangiovesse Fiano, Tamares y Tockai). Como dos de ellas (Tamares y Tockai) presentan reacción clara contra los tres antisueros policlonales, se puede inferir que podrían pertenecer a un aislamiento divergente de alguna de estas tres especies. La planta restante (Sangiovesse Fiano) si bien reactiva en DAS-ELISA mediante el set genérico GLRaV-4-9, no reaccionó en ELISA contra GLRaV-6 ni -7, y en WB con ninguno de los anticuerpos ni antisueros, salvo una tenue reacción con AS-Y252-IL (lo que podría deberse también a la baja especificidad del mismo). En virtud de este

comportamiento, es probable que esa muestra se encontrara infectada con GLRaV-9, pero la falta de un anticuerpo contra ese virus no permite confirmar este dato.

Como conclusión de los resultados serológicos, se confirma la presencia de GLRaV-5 y -6, y es posible la infección con GLRaV -9 en una de las plantas. Sin embargo la falta de reacción neta con algunos anticuerpos monoclonales condiciona esta afirmación. Estos resultados deberían ser validados a través de un estudio de la secuencia de la CP de los virus presentes en las plantas consideradas.

Capítulo V: **VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA CP DE
AMPELOVIRUS DEL SUBGRUPO I**

V.1 INTRODUCCIÓN

Con excepción de los *Ophiovirus* y los *Umbravirus*, los virus vegetales están encapsidados por una o más proteínas, llamadas proteínas de la cápside (CP). Históricamente, las CP de virus vegetales se dividen en tres grupos basados en la simetría del virión correspondiente: CP de virus icosaédricos, y dos tipos de CP para virus con simetría helicoidal, por un lado viriones rígidos, y por otro lado, partículas filamentosas (Callaway *et al.* 2001). Como las CP tienen poco nivel de conservación entre familias virales, el estudio de estas proteínas no es adecuado con fines taxonómicos a este nivel (Callaway *et al.* 2001) siendo más adecuado para una comparación entre familias, el uso de la polimerasa viral. La primer función asignada a la CP viral fue la de protección del material genético, pero actualmente se conoce que están involucradas en todos los procesos biológicos del virus, desde el ingreso a la célula huésped e inicio de la traducción de las proteínas involucradas en la replicación viral, hasta el ensamble de las nuevas partículas virales y el movimiento de estas en la planta (BoI 2008). Asimismo, es conocido el efecto de la CP como determinante de sintomatología y de especificidad de vectores (Hull 2002).

V.1A Estructura genética de ampelovirus del subgrupo I

Como se menciona en el capítulo I, los ampelovirus del subgrupo I, presentan notables diferencias en su estructura genética con todos los closterovirides conocidos. Un patrón considerado hasta ahora universal dentro de la familia, es la existencia del “Quintuple gene block” (Dolja *et al.* 2006). A diferencia de la gran mayoría de los virus de plantas RNA de sentido positivo, los closterovirides presentan una muy compleja estructura de su genoma. En todas las especies de la familia (excepto los miembros del subgrupo I hasta ahora secuenciados) se observa la presencia de un conjunto de 5 ORF, que codifican para una proteína hidrofóbica de 6 KDa, la HSP70h, una proteína de 60 KDa con homología con proteínas de shock

térmico de 90Kda, la CP principal (la que recubre la mayor parte del virión) y la CP duplicada (CPd). Estas cinco proteínas forman parte del virión maduro. Se ha determinado en el caso de los *Closterovirus*, que la CP recubre aproximadamente 95% del largo del virión, mientras que la CPd recubre el 5% restante. A través de microscopia de fuerza atómica, se determinó que la estructura del virión es más compleja aún, existiendo en el extremo recubierto por la CPd (correspondiente aproximadamente a 650 ribonucleótidos del extremo 5' del RNA genómico de BYV) una estructura formada por esta última proteína conjuntamente con HSP70h, p60 y una proteína presente solo en BYV de 20 KDa (Peremyslov *et al.* 2004).

En el caso de los ampelovirus del subgrupo I completamente secuenciados hasta ahora (GLRaV-Pr, PMWaV-1, *Plum bark necrosis stem pitting virus* y recientemente GLRaV-4,-5 y -6), se observa un menor tamaño de genoma (menores a 14,2 Kb comparados con los cerca de 18 Kb para GLRaV-1 y 3) y un menor número de ORFs comparados con todos los otros closterovirides, lo que también les vale el nombre de “ampelovirus cortos”. Notablemente en todos los ampelovirus del subgrupo I cuya secuencia cubre esa región, se observa la falta de una segunda proteína con dominios de CP (correspondiente a la CPd) (Good and Monis 2001; Alkowni *et al.* 2004; Maliogka *et al.* 2009; Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.* 2010; Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.* 2012; Thompson *et al.* 2012), sugiriendo que en el caso de estos ampelovirus, el virión estaría cubierto por solo una CP.

V.1B Variabilidad genética de la CP de los closterovirides

Si bien los closterovirides fueron de los últimos virus cuyo genoma comenzó a ser analizado, la cantidad de información generada en los últimos años, los posiciona como algunos de los virus con genética y genómica mas estudiadas en la actualidad.

El hecho de que el ORF de HSP70h sea muy conservado entre los miembros de la familia, permitió que un importante número de estudios de

variabilidad se realizara sobre este ORF. Sin embargo, análisis filogenéticos conducidos sobre las distintas proteínas conservadas en la familia, muestran la misma topología de los árboles filogenéticos consenso generados, agrupando las especies virales de acuerdo a su género de pertenencia (Dolja *et al.* 2006).

Con respecto al grado de variabilidad entre distintos ORF, se ha reportado para el caso de GLRaV-1 (*Ampelovirus*, subgrupo II) diferencias importantes en la variabilidad genética, siendo los ORF codificantes para CPd 1 y CPd 2 y HSP70h mucho mas variables que CP, demostrando una mayor presión de selección sobre esta última (Little *et al.* 2001).

El virus asociado a LD mas profundamente estudiado a nivel de variabilidad genética, es sin duda GLRaV-2 (*Closterovirus*) (Angelini *et al.* 2004; Bertazzon *et al.* 2010; Jarugula *et al.* 2010). De acuerdo a los datos de secuencias de HSP70h y CP de GLRaV-2, se han constituidos 5 grupos filogenéticos que conservan la topología básica para las dos proteínas (Jarugula *et al.* 2010). En el caso de la CP, se registran niveles de identidad aminoacídica tan bajos como 78% entre aislamientos de distintos grupos, muy por debajo del 90% requerido para considerarlos como una misma especie (Bertazzon *et al.* 2010).

Recientemente, Maliogka *et al.* (2008a) presentaron los datos de un estudio filogenético de distintos aislamientos de ampelovirus del subgrupo I provenientes de vid. Este estudio, conducido sobre secuencias codificantes para HSP70h y CP (con un menor número de secuencias para este último ORF) mostró un agrupamiento de las secuencias, provenientes de distintos aislamientos, de acuerdo a la supuesta especie viral, representando en consecuencia cada especie un linaje evolutivo diferente. Asimismo proponen como un criterio más fiable para demarcación de especies en este género, el análisis filogenético soportado por altos valores de bootstrap de las secuencias de nucleótidos del ORF codificante para la HSP70h, en lugar de las identidades aminoacídicas de la CP. Sin embargo, esta apreciación

necesitaría ser validada en profundidad, porque se ha descrito para ampelovirus una muy alta variabilidad intra-aislamiento en la HSP70h (Little *et al.* 2001), como así también una separación de grupos de aislamientos dentro de una misma especie viral (GLRaV-1) sostenidos por valores de bootstrap altos en esa misma región genética (Kominek *et al.* 2005).

De acuerdo a los criterios actuales de determinación de especies, la CP sigue jugando un rol fundamental en la taxonomía de especies virales. En consenso con los criterios utilizados en otros géneros de virus vegetales de ssRNA de sentido positivo, figuran el tamaño de la CP, las relaciones antigénicas y los niveles de identidad aminoacídica entre aislamientos. Considerando la escasa información disponible en bases de datos sobre secuencias completas de CP de ampelovirus del subgrupo I (al momento de efectuar el análisis existía solamente una secuencia completa de GLRaV-5, GLRaV-9, GLRaV-Carn, GLRaV-De y dos de GLRaV-4 y GLRaV-Pr), no es posible descartar el análisis de secuencias de CP como herramienta taxonómica dentro del subgrupo I, tal como proponen Maliogka *et al.* (2008a).

Como ya se presentó en el capítulo anterior, la taxonomía basada solamente en relaciones serológicas no llega a ser conclusiva en algunas circunstancias, dado que las reacciones cruzadas frente a distintos anticuerpos y antisueros, no permiten una clara asignación taxonómica.

V.2 MATERIALES Y MÉTODOS

V.2A Material vegetal

Los 41 materiales (de 35 variedades distintas) utilizados para este análisis fueron seleccionados en función de los análisis de ELISA y Western Blot (WB) realizados en el capítulo 4. Las plantas seleccionadas y su reactividad, se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII. Muestras utilizadas para análisis de RT-PCR, indicando su reactividad en ELISA.

Variedad	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-6	GLRaV-7	GLRaV-4-9
Airen	-	-	-	-	-	-
Aspirant Bouchet	-	+	-	+	-	-
Bequignol	-	-	-	-	-	-
Bianchetta Trevigiana	-	-	-	-	-	-
Blanquiña	-	-	-	-	-	-
Bobal	-	-	-	-	-	-
Buonamico	-	-	+	-	-	-
Cabernet Sauvignon D33	-	-	-	+	-	+
Cabernet Sauvignon LR50	-	-	-	-	-	+
Cabernet Sauvignon M1	-	-	-	+	-	+
Carmenere	-	-	-	+	-	+
Chardonnay	-	-	-	-	-	-
Colgadera	+	-	-	-	-	+
Escobera	-	+	-	-	-	+
Fosters white seedling (F1)	-	-	+	+	-	+
Fosters white seedling (F2)	-	-	-	-	-	-
Gamay de Freaux	-	-	-	+	-	-
Gamay de Freaux E16	-	-	-	+	-	+
Garbara Negra	-	-	-	+	-	-
Lambrusco Maestri	+	-	-	-	-	-
Lanjaron Claro	-	-	-	+	-	+
Maccabeu	-	-	-	-	-	-
Masse Camp	-	+	+	-	-	+
Mourvaison	-	+	+	-	-	+
Muscat de Saumur	-	-	-	-	-	-
No identificada (Inv3)	-	-	-	+	-	+
Pigato	-	-	+	-	-	+
Plavai	-	+	-	-	-	+
Sacy	-	-	-	-	-	+
Sangiovese Fiano	-	+	-	-	-	+
Shuyler	-	+	-	-	-	+
Syrah 805	-	+	-	+	-	+
Tamares (T1)	-	-	-	-	-	-
Tamares (T2)	-	-	+	-	-	+
Teneron	-	-	-	+	-	+
Tockai Friulano (TF1)	-	+	+	-	-	+
Tockai Friulano (TF2)	-	-	-	-	-	-
Torrontés Riojano	-	-	-	-	-	-
Uva de Loja	-	-	-	-	-	-
Verduzco Friulano	-	+	+	+	-	+
Volta	-	-	+	-	-	-

V.2B Diseño de primers para CP de ampelovirus del subgrupo I

Con el objeto de clonar la CP completa de los ampelovirus presentes en las muestras seleccionadas, se diseñaron un par de primers flanqueantes a la misma. Con este fin se utilizaron dos estrategias.

En primera instancia, se realizó un alineamiento múltiple de nucleótidos utilizando el programa ClustalW de las regiones correspondientes a el ORF de la CP más/menos 200 nucleótidos de las secuencias disponibles en base de datos de GLRaV-5, -9 -Pr y -De (respectivamente AF233934, AY297819, AM182328 y AM494935), obteniéndose secuencias de aproximadamente 1200 nt. Sobre este alineamiento múltiple se generó la secuencia consenso mediante el programa Cons del paquete EMBOSS, y sobre esta secuencia se buscaron primers con el programa Primer3!, excluyendo la región correspondiente al ORF de la CP. Los pares de primers resultantes (5 pares) fueron confrontados contra las secuencias originales mediante el programa Primersearch del paquete EMBOSS, como se detalló en el capítulo 3. Ninguno de los pares de primers resultantes hibridó con las 5 secuencias con un porcentaje de nucleótidos superior a 80%.

En consecuencia, se utilizó la metodología CODEHOP, descrita en el capítulo 3. Se realizó un alineamiento múltiple utilizando ClustalW de las secuencias aminoacídicas correspondientes a HSP90h y p23 de GLRaV-5, -9 -Pr y -De (accesiones Genpept para HSP90h: CAO86170, AAQ63811, YP_002364306 y ACJ03866; para p23: AAK38611, AAQ63813, CAR91977 y YP_002364308). Los alineamientos fueron utilizados para identificar bloques conservados mediante el Multiple Alignment Processor del servidor Blockmaker disponible en http://blocks.fhcrc.org/blocks/process_blocks.html. Solo se consideró el último bloque identificado hacia el extremo C-terminal para HSP90h y el primero hacia el extremo N-terminal para p23 para el diseño de primers utilizando CODEHOP. Al realizar la confrontación utilizando Primersearch, un primer identificado sobre HSP90h (Ampelo

CPbisF 5' GCT GGA TAG GTT YAG RTC NAA AGA YAC YCC 3') mostró valores de mismatch menores a 2 nucleótidos sobre las secuencias originales de nucleótidos, pero los primers obtenidos sobre p23 no mostraron valores satisfactorios.

Finalmente, sobre el alineamiento de nucleótidos obtenido inicialmente, se seleccionó manualmente la secuencia 5' TAA CCT CCA TAT TTT CAA ACG 3' como primer reversa (Ampelo CPbisR), el cual mostró valores de mismatch muy bajos entre las secuencias confrontadas.

V.2C Amplificación, clonación, secuenciación y obtención de secuencia de la CP

Los primers diseñados fueron utilizados para amplificar cDNA obtenido por random priming desde el dsRNA de las muestras detalladas en la Tabla XII, mediante PCR utilizando el programa AmpeloCPbis. Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Para evaluar la ocurrencia de múltiples infecciones, los productos de amplificación fueron digeridos directamente como se detalla en el capítulo 2, utilizando conjuntamente las enzimas de restricción AluI y HinfI. Los productos de restricción fueron resueltos por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

El producto de amplificación íntegro fue clonado utilizando el kit pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA), y el producto de ligación utilizado para transformar bacterias competentes químicas Top10F' (Invitrogen, California, USA). Sobre las placas de transformación se seleccionaron colonias blancas para screening por PCR utilizando los primers AmpeloCPbis F/R. Las colonias que presentaron inserto del tamaño esperado (aproximadamente 1,1 Kb), fueron amplificadas nuevamente, y el producto de amplificación restringido con AluI y HinfI, como se menciona arriba. Se seleccionó una colonia de cada muestra con inserto para secuenciar. En el

caso de obtenerse patrones de restricción que indicaran infecciones mixtas, se seleccionó una colonia por cada patrón de restricción.

Las colonias seleccionadas fueron cultivadas en 5 ml de medio LB/Amp toda la noche en agitación a 37°. A partir de los cultivos saturados, se realizaron extracciones de ADN plasmídico utilizando el método Merlín. Los ADN resultantes fueron cuantificados mediante comparación con el marcador Lambda/HindIII+EcoRI (Fermentas, Canadá), y tras normalizar la concentración a 50 ng/ul, enviados a secuenciar utilizando los primers M13 F/R al servicio de secuenciación de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología de INTA.

Las secuencias sentido y antisentido obtenidas fueron ensambladas utilizando el programa Contig Express del paquete Vector NTI 8 (Informax). Sobre la secuencia resultante, se identificaron los primers AmpeloCPbis F/R con el programa Primersearch, y eliminados conjuntamente con los fragmentos secuenciados del vector. La secuencia correspondiente al ORF de la CP fue identificada con el programa GETORF del paquete EMBOSS. Las secuencias correspondientes al ORF completo (incluido el codón de terminación) fueron depositadas en la base de datos GenBank bajo los números de acceso HQ828110–HQ828139.

V.2D Análisis de secuencias

Los virus, al igual que todos los organismos biológicos, pueden en su multiplicación generar individuos genéticamente distintos a sus progenitores, derivando en poblaciones genéticamente heterogéneas, y con distribuciones de frecuencia que pueden cambiar con el tiempo. Este proceso es llamado evolución. El estudio de este proceso evolutivo puede encararse desde dos puntos de vista principales. Por un lado, entender los mecanismos involucrados en este proceso, y conocer como ellos dan forma a la estructura genética de la población; y por otro lado, estudiar la historia evolutiva de los organismos y las relaciones filogenéticas entre ellos.

Los principales mecanismos involucrados en la evolución y consecuente especiación de virus de RNA, son las mutaciones puntuales y los eventos de recombinación (García Arenal and Fraile 2008). La falta de consideración de recombinación en un conjunto de secuencias utilizadas para un análisis evolutivo, puede conducir a una interpretación errónea los resultados obtenidos.

Con el propósito de no sesgar el análisis evolutivo de las secuencias a analizar, se realizó un análisis de ocurrencia de recombinación, utilizando el programa GARD (Genetic Algorithm Recombination Detection) del paquete HyPhy (Kosakovsky Pond *et al.* 2006), corriendo en el servidor Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/>). Para este análisis, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias codificantes correspondientes a la CP obtenidas de las secuenciaciones, como así también las disponibles en bases de datos correspondientes a ampelovirus del subgrupo I asociados a LD. Estas secuencias, conjuntamente con las secuencias codificantes para la CP de los ampelovirus del subgrupo I asociados a LD presentes en las bases de datos (GLRaV-4: AM162279, AM176759; GLRaV-5: AF233934; GLRaV-9:AY297819; GLRaV-Pr: AM182328, FJ907331; GLRaV-De: AM494935; GLRaV-Carn: FJ907331) y las secuencias recientemente obtenidas de GLRaV-4 y GLRaV-6 (FJ467503 y FJ467504 cedidas previa a su publicación por el Dr S. Sabanadzovic) fueron alineadas con el programa RevTrans (Wernersson and Pedersen 2003) disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/RevTrans/>. Este alineamiento fue utilizado en primer lugar para determinar el modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado, mediante el test de selección de modelos de DataMonkey. Con el modelo de sustitución seleccionado, se realizó el análisis de GARD, infiriéndose un solo posible sitio de recombinación (posición 228). Este evento de recombinación fue confirmado mediante el análisis del mismo conjunto de datos mediante el programa Simplot (Lole *et al.* 1999) y RDP3 (Martin *et al.* 2010). Para evitar errores en los posteriores análisis, se generaron

dos subsets desde el alineamiento múltiple (desde las posiciones 1-228 y desde la posición 229 hasta el final), y sobre estos alineamientos, se trabajó por separado. En ambos se repitió el análisis de selección de modelo de sustitución de nucleótidos, GARD, y al no encontrarse evidencia que permitiera inferir recombinación en estos segmentos, se realizaron los análisis para identificación de selección positiva, sometiendo los alineamientos de codones a tres análisis: Single-Likelihood Ancestor Counting (SLAC), Fixed Effects Likelihood (FEL) y Random Effects Likelihood (REL) (Kosakovsky Pond and Frost 2005). Los resultados fueron consensuados mediante el Integrative Selection Analysis del servidor Datamonkey, donde se suman los sitios detectados por al menos uno de los algoritmos para un umbral de probabilidad dado (en este caso, se utilizaron valores de p de 0,1 para SLAC y FEL, y factor de Bayes de 50 para REL).

El mismo alineamiento múltiple de nucleótidos, adicionado de las secuencias correspondientes a la CP de PMWaV-1 (AF414119) y PMWaV-3 (FJ209048) como outgroup, fue utilizado para realizar inferencias filogenéticas mediante el programa PAUP* (Swofford 2000) mediante análisis de parsimonia (Maximum Parsimony, MP) y de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML). Inicialmente, se realizó una evaluación del ajuste de 56 modelos de selección de nucleótidos. Sobre este resultado se seleccionó el modelo con menor valor de Criterio Informativo Akaike (Akaike Information Criterion, AIC) mediante el programa Modeltest (Posada and Crandall 1998). En base al modelo de sustitución seleccionado, se construyó el árbol que mejor se ajusta el conjunto de datos observados mediante ML. Los valores de bootstrap para este árbol fueron calculados mediante el software GARLI (Zwickl, 2006) a partir de 1.000 réplicas, y mediante el programa PAUP* a partir de 100 réplicas. Asimismo, se determinaron por MP los árboles que mejor explican la historia evolutiva. A partir de los árboles obtenidos, se generó el árbol consenso de la mayoría. La robustez de este último fue determinada

por un valor análisis de bootstrap de 500 replicas. El árbol consenso final fue visualizado con el programa FigTree.

Las distancias genéticas entre secuencias, dentro de cada grupos de secuencias (definiéndose para este fin los grupos GLRaV-4-like, GLRaV-5-like, GLRaV-9-like, GLRaV-Pr-like, GLRaV-6/De-like y GLRaV-Carn, de acuerdo a la cercanía con cada una de las especies tipo en el análisis filogenético), y medias entre grupos de secuencias, se calcularon utilizando el programa MEGA 5.0, utilizando el modelo Maximum Composite Likelihood, estimando el valor de desviación estándar mediante un bootstrap de 1000 réplicas.

Las secuencias aminoacídicas correspondientes a las CP fueron analizadas mediante el software Bepipred 1.0, con el objeto de identificar posibles epítopes lineales. Este método utiliza una combinación de escalas de propensión y un modelo de Markov oculto para la estimación de las probabilidades de que un determinado aminoácido forme parte de un epítope lineal. Este método, si bien tiene menor sensibilidad que otros basados en escalas de propensión, presenta una alta especificidad. Se estableció para cada una de los análisis un valor umbral de detección de 1.30, lo que equivale a una especificidad mayor a un 96%.

V.3 RESULTADOS

V.3A Amplificación de la CP

El par de primers Ampelo-CP-bis-F/R, amplificó un producto del tamaño esperado (aproximadamente 1.100 bp) en todas las muestras con reacción positiva en ELISA contra GLRaV-6 y GLRaV-4-9 (Figura 14 A), y en ninguna de las muestras negativas en ELISA para estos dos análisis. La restricción del producto de PCR con AluI y HinfI, produjo en algunos casos un número de bandas que sugirió infecciones mixtas con más de una variante genética presente en la planta analizada (Figura 14 B, calles 2, 5 y 7).

En todos los casos, a través del screening por PCR-RFLP, se pudieron identificar los clones responsables de las distintas bandas presentes en los productos de RT-PCR (Figura 15).

El número de variantes genéticas identificadas por RT-PCR-RFLP y confirmadas por screening de colonias mediante PCR-RFLP, se detalla en la tabla XIII.

Las siguientes muestras presentaron un comportamiento inesperado en colony RT-PCR y/o secuenciación:

Foster WS F1: Se observó un patrón mixto en RT-PCR-RFLP, pero solo se identificó un patrón en colony PCR-RFLP. Se secuenció un solo clon (Figura 14B Calle 5, Figura 15 B).

Masse Camp: Se observaron 4 patrones en colony PCR-RFLP. Se secuenciaron 4 clones, cada uno correspondiente a cada uno de los patrones, de los cuales 2 resultaron idénticos (Figura 14B Calle 2, Figura 15C).

Plavai: Se observaron 2 patrones en colony PCR-RFLP. Se secuenciaron 2 clones, los cuales resultaron idénticos (Figura 14B Calle 4)

Las muestras Gamay de Freaux, Mourvaissou, Lanjarón y Syrah, mostraron patrones en RT-PCR-RFLP idénticos a Gamay de Freaux E16, Pigato, Escobera y Cabernet Sauvignon M1 respectivamente, y no fueron secuenciados.

Después del ensamble de las dos secuencias complementarias obtenidas con los primers pUC/M13 F/R y de la remoción de la secuencia correspondiente a los primers Ampelo-CP-Bis F/R, en las secuencias obtenidas se identificó un ORF de 807 nucleótidos, salvo en el caso de los clones: Sangiovesse Fiano (804 nt), Colgadera1 (795nt), Escobera (816nt) y Verduzco A5 (813nt).

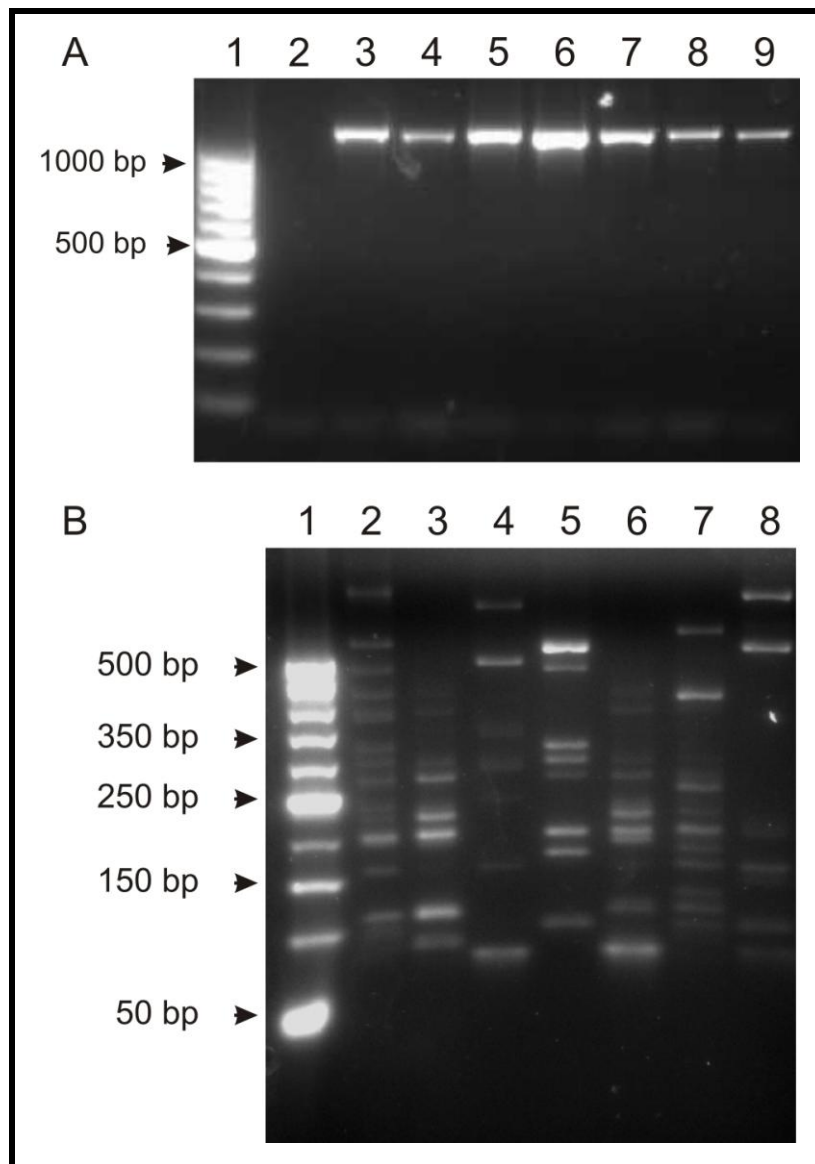


Figura 14. A) Producto de amplificación obtenido con los primers Ampelo CP Bis F/R; 1- Marcador de peso molecular 100 bp ladder; 2- Control negativo; 3-9 Muestras positivas en ELISA para GLRaV-6 y/o 4-9. B) Restricción con AluI + HinfI del producto de amplificación obtenido con los primers Ampelo CP Bis F/R; 1- Marcador de peso molecular 50bp ladder; 2-9 Muestras positivas en RT-PCR

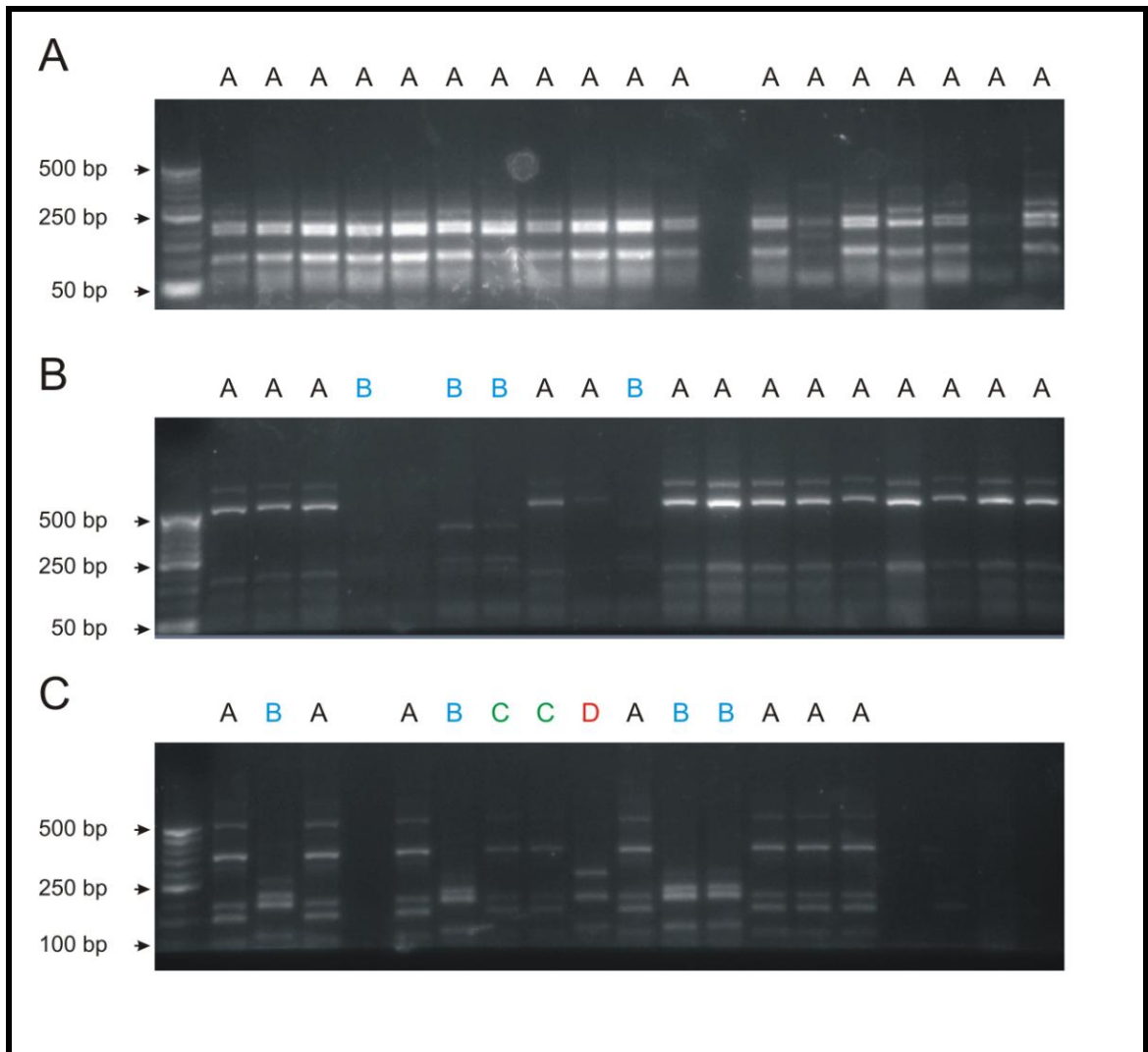


Figura 15. Colony PCR-RFLP de transformaciones con productos de amplificación obtenido con los primers Ampelo CP Bis F/R clonados en pGEM T Easy a partir de muestras infectadas con ampelovirus del subgrupo I. A) Muestra con patrón único en RT-PCR-RFLP; todas las colonias muestran el mismo patrón (Muestra Sacy, correspondiente a carril 3 Figura 1 B). B) Muestra con patrón mixto en RT-PCR-RFLP. C) Muestra con cuatro patrones (Muestra Masse Camp, correspondiente a carril 2 Figura 1 B)

Tabla XIII. Resultados de RT-PCR y colony blot PCR-RFLP sobre las muestras de vid analizadas. NT: restricción no realizada. NS: muestra no secuenciada

Variedad	Amplificación AmpeloCPBis	Restricción HinfI+ AluI	Variantes identificadas en Screening PCR-RFLP	Clones secuenciados
Airen	-			
Aspirant Bouchet	+	Simple	NT	1
Bequignol	-			
Bianchetta Trevigiana	-			
Blanquiña	-			
Bobal	-			
Buonamico	-			
Cabernet Sauvignon D33	+	Simple	1	1
Cabernet Sauvignon LR50	+	Simple	1	1
Cabernet Sauvignon M1	+	Simple	NT	1
Carmenere	+	Simple	1	1
Chardonnay	-			
Colgadera	+	Mixto	2	2
Escobera	+	Simple	1	1
Fosters white seedling (F1)	+	Mixto	1	1
Fosters white seedling (F2)	-			
Gamay de Freaux	+	Simple	NT	NS
Gamay de Freaux E16	+	Simple	1	1
Garbara Negra	-			
Lambrusco Maestri	-			
Lanjaron Claro	+	Simple	NT	NS
Maccabeu	-			
Masse Camp	+	Mixto	4	4
Mourvaison	+	Simple	NT	NS
Muscat de Saumur	-			
No identificada (Inv3)	+	Simple	1	1
Pigato	+	Simple	NT	1
Plavai	+	Simple	2	2
Sacy	+	Simple	1	2
Sangiovese Fiano	+	Mixto	2	2
Shuyler	+	Mixto	4	4
Syrah	+	Simple	1	NS
Tamares (T1)	-			
Tamares (T2)	+	Simple	2	2
Teneron	+	Simple	2	2
Tockai Friulano (TF1)	+	Simple	1	1
Tockai Friulano (TF2)	-			
Torrontés Riojano	-			
Uva de Loja	-			
Verduzco Friulano	+	Mixto	2	2
Volta	-			

V.3B Análisis de secuencias

El alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas obtenidas correspondientes a la CP completa de los ampelovirus del subgrupo I, mostró diferencias notables en el grado de conservación a lo largo de la proteína. El

extremo N-terminal mostró un elevado grado de variabilidad (primeros 20 aminoácidos), mientras que el extremo C-terminal presentó una alta conservación entre todas las secuencias consideradas (Figura 16). Estos resultados son más evidentes al comparar las matrices de identidad de secuencia aminoacídica dentro de y entre grupos, considerando la CP completa, los primeros 24 aminoácidos y desde la posición 25 hasta la final (Tablas XIV, XV y XVI). A partir del alineamiento de proteínas, se generó el correspondiente alineamiento de codones, el cual fue utilizado para el análisis evolutivo.

Tabla XIV. Valores de identidad aminoacídica entre secuencias de la CP pertenecientes a distintos grupos. Secuencia completa

		GLRaV-4	GLRaV-5	GLRaV-9	GLRaV-6	GLRaV-Pr	GLRaV-Carn
Identidad entre grupos	Identidad dentro del grupo	99-94	100-92	97	100-89	97	-
	Identidad entre secuencias locales		100-93		100-92		
	GLRaV-4		83-80	81-80	81-79	79-76	78-77
	GLRaV-5			87-85	87-83	77-75	78-77
	GLRaV-9				87-84	77-75	78
	GLRaV-De					75-71	78-75
GLRaV-Pr						75	

Tabla XV. Valores de identidad aminoacídica entre secuencias de la CP pertenecientes a distintos grupos. Primeros 24 aminoácidos (N-terminal)

		GLRaV-4	GLRaV-5	GLRaV-9	GLRaV-6	GLRaV-Pr	GLRaV-Carn
Identidad entre grupos	Identidad dentro del grupo	95-50	100-21	78	100-15	83	-
	Identidad entre secuencias locales		100-50	-	100-42		
	GLRaV-4		36-9	14-9	27-5	35-9	23-14
	GLRaV-5			35-15	53-5	13-0	15-5
	GLRaV-9				40-15	30-13	11-6
	GLRaV-De					22-9	20-0
	GLRaV-Pr						13

Tabla XVI. TValores de identidad aminoacídica entre secuencias de la CP pertenecientes a distintos grupos. Desde posición 25 hasta final (C-terminal)

		GLRaV-4	GLRaV-5	GLRaV-9	GLRaV-6	GLRaV-Pr	GLRaV-Carn
Identidad entre grupos	Identidad dentro del grupo	99-98	100-96	99	100-93	98	
	Identidad entre secuencias locales		100-96		100-94		
	GLRaV-4		88-86	87-86	84-83	83-82	84-83
	GLRaV-5			92-90	92-87	84-81	83-82
	GLRaV-9				92-89	82-81	84
	GLRaV-De					81-77	83-81
	GLRaV-Pr						82

Previo al análisis por GARD, la herramienta de determinación de modelos de sustitución, identificó el modelo TN93 (010020) como el que

mejor encajaba para el conjunto de datos analizados. En el análisis GARD se encontró una incongruencia topológica entre los árboles analizados, infiriéndose un punto recombinación en la posición 228 (valido para un valor de $p > 0,05$). La topología de los árboles resultantes se muestra en la figura 17, donde se puede observar que las secuencias correspondientes a GLRaV-9 (AY297819 y HQ828111) y GLRaV-Carn serían las involucradas en el evento recombinatorio. También se destacan cambios menores en la topología dentro de los brazos correspondientes a GLRaV-5-like y GLRaV-6-like. Este evento de recombinación fue confirmado mediante Simplot y 3 algoritmos del programa RDP3.

Como consecuencia de este análisis, se dividió el alineamiento múltiple de codones en 2 subsets (Subset 1: posiciones 1-228; Subset 2: posiciones 229-final), los cuales fueron sometidos al mismo análisis. En estos dos subsets, se determinaron modelos de sustitución diferentes. Para el primer conjunto de datos (posiciones 1-228) se identificó el modelo 012212, mientras que para el segundo conjunto de datos, el modelo TN93 (010020) fue el que mejor se ajustó a los datos. Los mismos modelos de sustitución fueron identificados al evaluar los dos conjuntos de datos mediante PAUP y Modeltest, registrándose también diferencias en las frecuencias de nucleótidos. Este comportamiento de modelos diferenciales en un mismo conjunto de datos, ha sido reportado previamente para HIV (Posada and Crandall 2001) e Influenza A (Kryazhimskiy et al. 2008). Ambos subsets se analizaron por GARD, previo a lo cual se identificaron pares de secuencias idénticas, de las cuales una de las replicas fue eliminada (Subset 1: Shuyler A1=Escobera; Inv3=G.de Freaux E16; Sacy = Shuyler A10; Foster WS= G.de Freaux E16; Subset 2: Shuyler A5= Shuyler B3). El análisis GARD no registró evidencia de recombinación para un valor de $p > 0,1$ en ninguno de los dos conjuntos de datos.

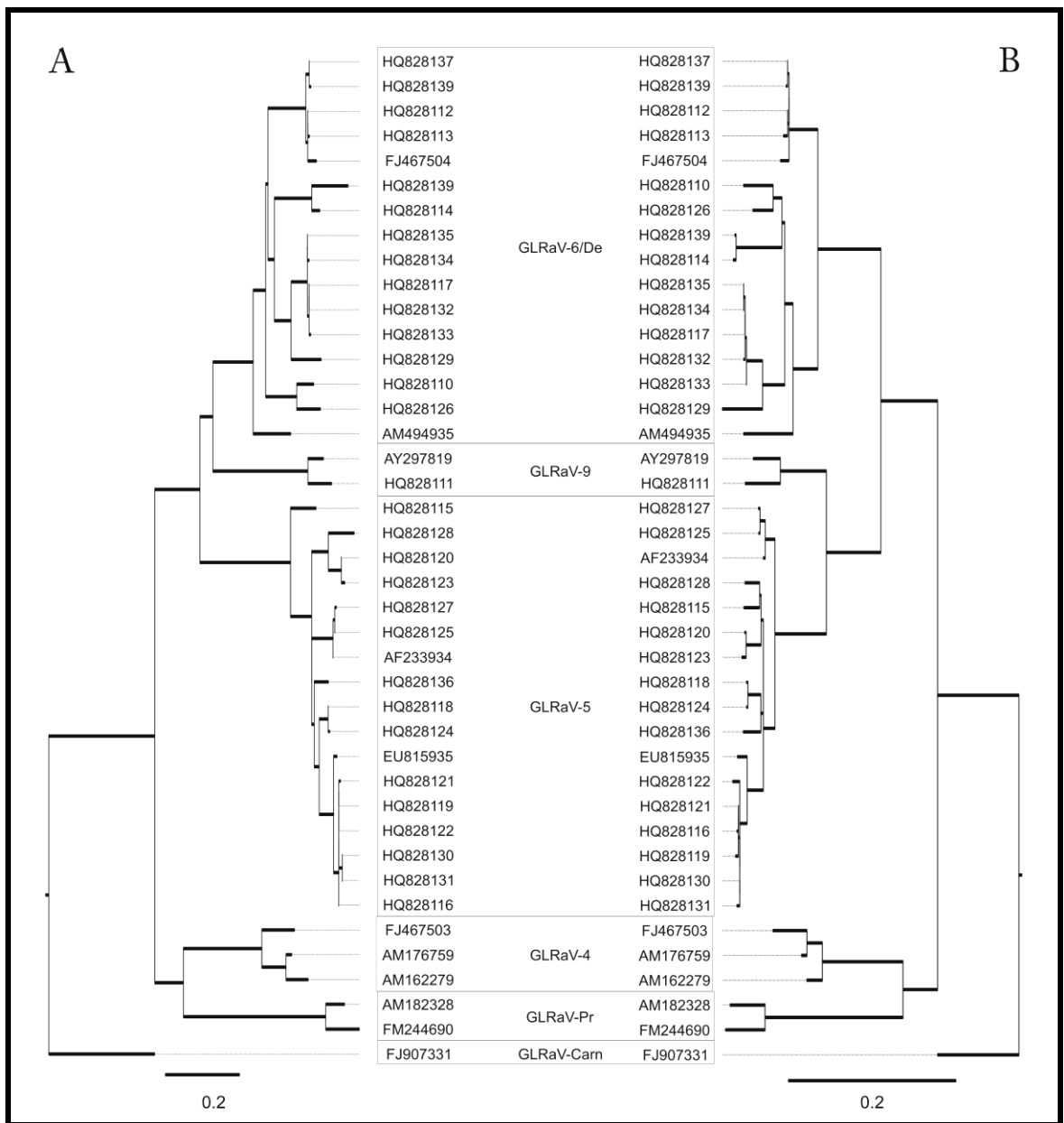


Figura 17. Topología de los dos árboles determinados por GARD. A) Posiciones 1-219. B) Posiciones 220-final. Nótese en rojo los cambios que corresponden a cambios en las posiciones que involucran posibles especies, y en azul y verde los cambios dentro de los grupos GLRaV-5-like y GLRaV-De-like, respectivamente.

Los dos alineamientos (1-228 y 229-fin) fueron analizados para detectar presión de selección por SLAC, FEL y REL. En el primer conjunto de datos (posiciones 1-219, correspondiendo a 76 codones) se identificaron por REL, 8 sitios con selección positiva (uno de los cuales también fue

identificado por FEL), mientras que en el análisis integrador, se detectaron 50 sitios con selección negativa por al menos uno de los tres métodos de análisis. También se detectaron 5 sitios con evidencia significativa de selección positiva por un método (REL) pero valores $d_N > d_S$ determinados por alguno de los otros dos métodos. En el caso del segundo conjunto de datos (posiciones 229-final, comprendiendo 200 codones), ningún método identificó selección positiva, y en el análisis integrativo, al menos por SLAC o FEL, 164 sitios fueron identificados como bajo presión negativa. El análisis REL en este conjunto de datos sugirió que todos los sitios se encuentran bajo selección purificante, ya que en ninguna posición se obtuvo un valor de $d_N > d_S$. Los valores globales de d_N/d_S obtenidos por SLAC de los tres conjuntos de datos se presentan en la tabla XVII. Los valores obtenidos sitio por sitio se presentan en el Anexo IV.

Tabla XVII. Valores de d_N/d_S obtenidos por SLAC y REL desde los tres conjuntos de datos considerados

Posiciones	SLAC d_N/d_S	REL d_N/d_S
1–228	0.281	0.351
229–828	0.046	0.047
1–828	0.117	0.119

Las notables diferencias de valor entre los dos sub-conjuntos de datos, se deben a la ocurrencia de posibles sitios de selección positiva. La baja relación d_N/d_S del extremo C-terminal, implica una muy fuerte presión de selección, lo que está de acuerdo con el alto número de codones bajo selección negativa identificados por los tres análisis en esta región, y con el grado de conservación observado en el alineamiento múltiple de secuencias (Figura 16). Si bien el valor de d_N/d_S para el extremo N-terminal es menor a 1, lo cual implica selección purificante, el tener un valor 6 veces mayor que el extremo C-terminal sugiere una presión de selección diferencial en ambas regiones.

AM162279		MAS~VGNNAQVGVSPPIVPPRTTEQLRAREEQEKDLEEINALFVATGRVTVDFDALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
AM176759	GLRaV-4	MAS~VGNNAQTFGVSPPIVPPRTTEGQRAREEQEKDLEEINALFVATGRVTVDFDALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
FJ467503		MAN~LSGNAQLFNANPPTTPTTTEGQRAREEQEKDLEEINALFVATGRVTVDFDALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
AF233934		~~~~MSGASQNVAPALPTTSPHTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828120		~~~~MSGTVPNVAPTQVTPPTTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828121		~~~~MSGVQGVVPTLPANPFVSTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828115		~~~~MSGVQVNVLTTPPTTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828118		~~~~MSGVQNVAPTLPANPPISTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828123		~~~~MSGTVPNVAPTQVTPPTTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828124		~~~~MSGVQNVAPTLPANPPISTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
EU815935		~~~~MSGSQDVVPTLPANPFVSTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828119	GLRaV-6/De	~~~~MSGSQGVVPTLPANPFVSTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828116		~~~~MSGVQGVVPTLPANPFVSTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828125		~~~~MSGVQNVAPALPTTSPHTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828127		~~~~MSGVQNVAPALPTTSPHTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828128		~~~~MSGASQSVIPTVQVPPPTTTEAERKAREAKEADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828131		~~~~MSGVQGVVPTLPANPFVSTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828130		~~~~MSGVQGVVPTLPANPFVSTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828136		~~~~MSGTVQNVPTVPADPFNSSTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828122		~~~~MSGVQGVVPTLPANPFVSTTEAERKAREDEKADLEEIQSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
AY297819		~~~~MAQVPTTAPAVSTPPLTPTTEERKREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828111	GLRaV-9	~~~~MAQVPTTPEVVQTPPLTPTTEERKREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
FJ907331	GLRaV-Carn	~~~~MASETOGIGOGELQVTTTEGQRAREEREKLEEEISLPLHGRNTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
AM494935		~~~~MSGTVDPAPVSPVTPSSPLPSEADRAREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828110		~~~~MSSQVPTPLFVPTPTPTVTEADRAREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828119		~~~~MSDTTTPAANVNPTPARLPSEADRAREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
FJ467504		~~~~MSGTELPATGVPTPQSTTEAERKAREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828126		~~~~MSSQVPTPLFPTTPTTTEADRAREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828129		~~~~MSDAATPAANVNPTPLRPSSEADRAREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828132		~~~~MSDTTTPAANVNPTPARLPSEADRAREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828133	GLRaV-5	~~~~MSDTTTPAANVNPTPARLPSEADRAREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828134		~~~~MYDTTTPAANVNPTPARLPSEADRAREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828135		~~~~MSDTTTPAANVNPTPARLPSEADRAREEREKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828112		~~~~MSGTVLPAATGVPAQPESTSEANRKAREEKEKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828113		~~~~MSGTVLPAATGVPAQPESTSEANRKAREEKEKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828137		~~~~MSGTVLPAATGVPAQPESTSEANRKAREEKEKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828138		~~~~MSGTVLPAATGVPAQPESTSEANRKAREEKEKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828114		~~~~MSTTTTPVNDVPPPPPESEANRKAREEKEKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
HQ828139		~~~~MSTTTTPVNDVPPPPPESEANRKAREEKEKLEEEISLFWQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
AM182328	GLRaV-Pr	MTERVTASNPTTGAQPTVPERGTPQKAREDEKAEIDENSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL
FM244690		MTERVTASNPPAGVTQPPVTERGATPQKAREDEKAEIDENSLFVQGRRTVDFEALINSANGVLDLTKLEIPRLENVAIPGIVSGKHKVIGARAL

Figura 18. Distribución de los sitios identificados bajo presión de selección en los primeros 100 aminoácidos de las secuencias consideradas. En tonos de rojo, sitios bajo presión de selección negativa. En tonos de azul, los 8 sitios bajo presión de selección positiva identificados. Sombreados mas claros, sitios inferidos significativamente por un método. Sombreados mas oscuros, sitios inferidos por los tres métodos.

V.3C Análisis filogenético

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias obtenidas en este estudio y las disponibles en las bases de datos, fueron estimadas por análisis de MP y ML. En un análisis preliminar, cinco grupos de secuencias provenientes de cinco plantas, se agruparon entre sí (4 pares de secuencias de de las plantas Masse Camp, Sacy, Teneron y Tockai Friulano, y 4 secuencias de la planta Shuyler). Estos grupos de secuencias fueron consensuados, y una sola secuencia por cada uno fue considerada en adelante con el objeto de evitar un análisis filogenético sesgado. En total fueron analizadas 36 secuencias (incluyendo PMWaV-1 y PMWaV-3 como

outgroup). Los grupos identificados fueron nominados de acuerdo a la presencia de las secuencias propuestas como aislamiento tipo dentro del género (GLRaV-4, -5, -9, -Pr, -6 y -Carn). En el Grupo de GLRaV-6 se agrupó consistentemente la secuencia perteneciente a GLRaV-De, por lo que en adelante se consideraron como un solo grupo. La topología del árbol consenso de la mayoría de MP y el mejor árbol obtenido por ML fueron equivalentes. La robustez de los brazos correspondientes a los distintos grupos fue soportada por altos valores de bootstrap (Figura 19). Las secuencias resultantes de las muestras locales se agruparon mayormente en los grupos GLRaV-5-like (13 secuencias) y GLRaV-6-like (9 secuencias), solo una secuencia en el grupo GLRaV-9-like, y ninguna en los grupos de GLRaV-4, Carn y Pr-like (Figura 19). Estos grupos constituidos fueron utilizados para determinar las distancias evolutivas medias dentro de cada grupo y medias entre grupos ajustando un modelo de sustitución de nucleótidos a través de Maximum Composite Likelihood. Paralelamente a este análisis, se realizó la misma evaluación sobre las secuencias disponibles en base de datos de las CP de GLRaV-2 y -3. Los resultados se presentan en la tabla XVIII.

Las distancias genéticas estimadas dentro de cada grupo variaron, pero fueron similares a las calculadas para GLRaV-2 (un valor estimado de 0.118 sobre 113 secuencias completas y parciales disponibles) y GLRaV-3 (0.072 sobre 164 secuencias disponibles). Considerando solamente GLRaV-5 y GLRaV-6, el primero exhibió un valor de diversidad similar al de GLRaV-3 y el último un valor apenas menor a GLRaV-2. Sin embargo, cuando todas las secuencias de los ampelovirus del subgrupo I se analizaron como una sola especie, la distancia genética promedio dentro de ese grupo fue de 0.249 un valor muy superior al presentado por GLRaV-2, considerada hasta el momento como la especie más variable dentro de los virus asociados a leafroll.

Variabilidad genética de la CP
de ampelovirus del subgrupo I

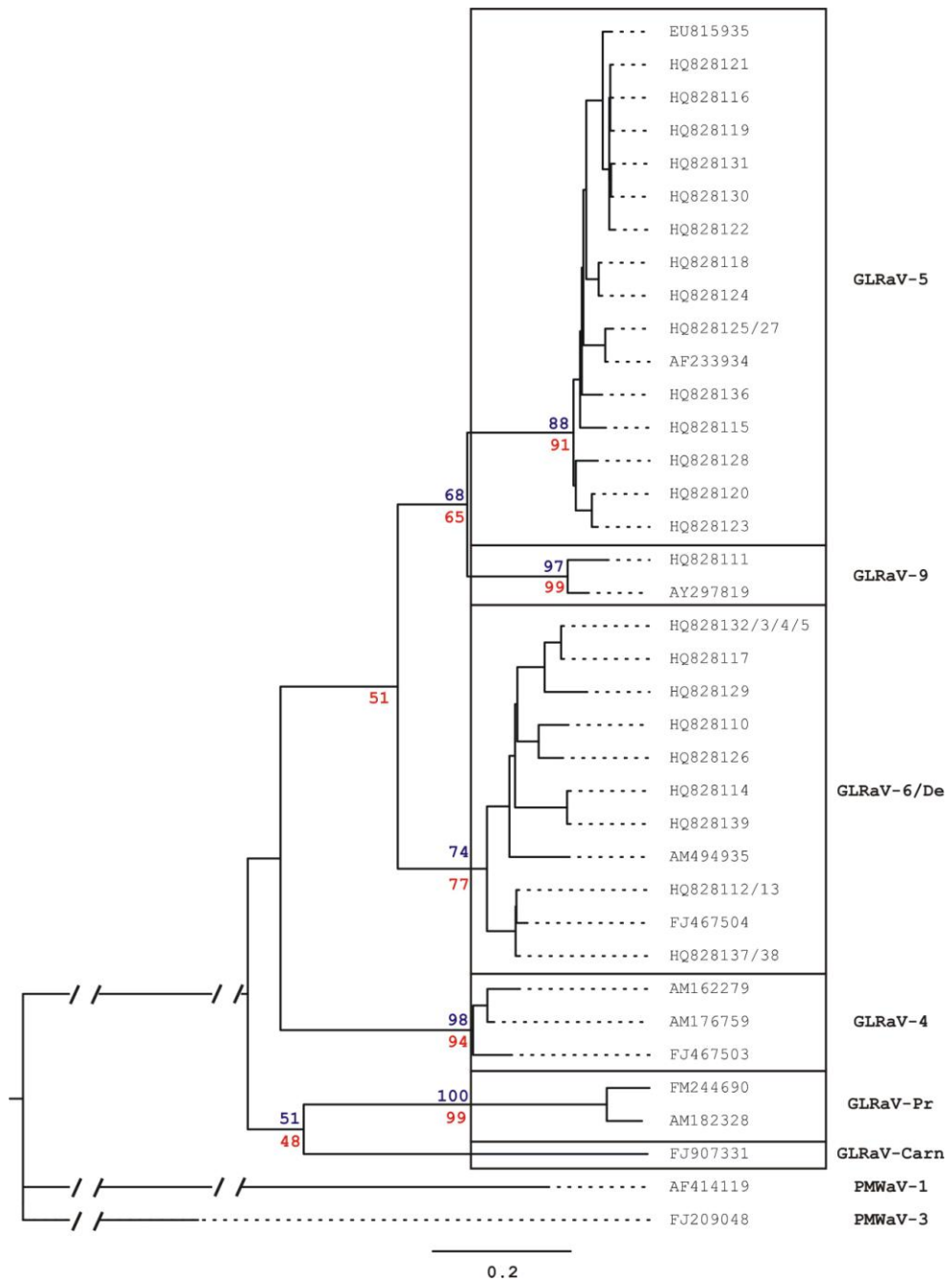


Figura 19. Árbol filogenético obtenido por ML. Los grupos fueron definidos en función de la presencia en cada cluster de una secuencia de referencia. Se presentan en cada nodo los valores de soporte de bootstrap obtenidos de 100 réplicas mediante PAUP(en color azul) y de 1000 replicas mediante Garli (en color rojo)

Tabla XVIII. Estimación de la divergencia evolutiva sobre pares de secuencias dentro de cada y entre grupos. Número de sustituciones por sitio promedio entre todos los pares de secuencias dentro de cada y entre grupos. Los resultados están basados en análisis de 62 secuencias apareadas. Las estimaciones de los errores estándar se muestran entre paréntesis, fueron obtenidos por un proceso de bootstrap de 1000 réplicas.

		GLRaV-4	GLRaV-5	GLRaV-9	GLRaV-Car	GLRaV-6	GLRaV-Pr
Nº de secuencias		3	15	2	1	10	2
Distancia promedio dentro del grupo		0.081 (0.009)	0.059 (0.005)	0.085 (0.011)	n/c	0.111 (0.008)	0.106 (0.012)
Distancia entre promedio grupos	GLRaV-4		0.345 (0.023)	0.350 (0.023)	0.391 (0.025)	0.350 (0.022)	0.382 (0.024)
	GLRaV-5			0.254 (0.017)	0.384 (0.026)	0.288 (0.019)	0.438 (0.027)
	GLRaV-9				0.406 (0.028)	0.288 (0.019)	0.4381 (0.027)
	GLRaV-Carn					0.381 (0.024)	0.431 (0.026)
	GLRaV-6						0.407 (0.025)

El análisis de predicción de epítopes lineales produjo resultados similares para todas las secuencias de ampelovirus del subgrupo I. La figura 20 muestra los epítopes predichos para cada una de las secuencias consideradas, determinados con un valor de umbral mínimo de 1.30. Como se puede apreciar, todas las secuencias presentan un epítope en los primeros 25 aminoácidos. Cuando se analizan los datos estimados para todos los aminoácidos en las distintas secuencias, el valor estimado para ese primer epítope es el más alto de toda la secuencia (figura 18). Al representar el valor promedio entre todas las secuencias del puntaje predicho para cada posición, confrontado con los sitios identificados como bajo distinta presión de selección, es clara la asociación entre la ubicación de los posibles determinantes antigénicos, la región de alta variabilidad y los sitios con presión de selección diversificante. (Figura 19). Los datos obtenidos sitio por sitio para cada secuencia se presentan en el anexo V.

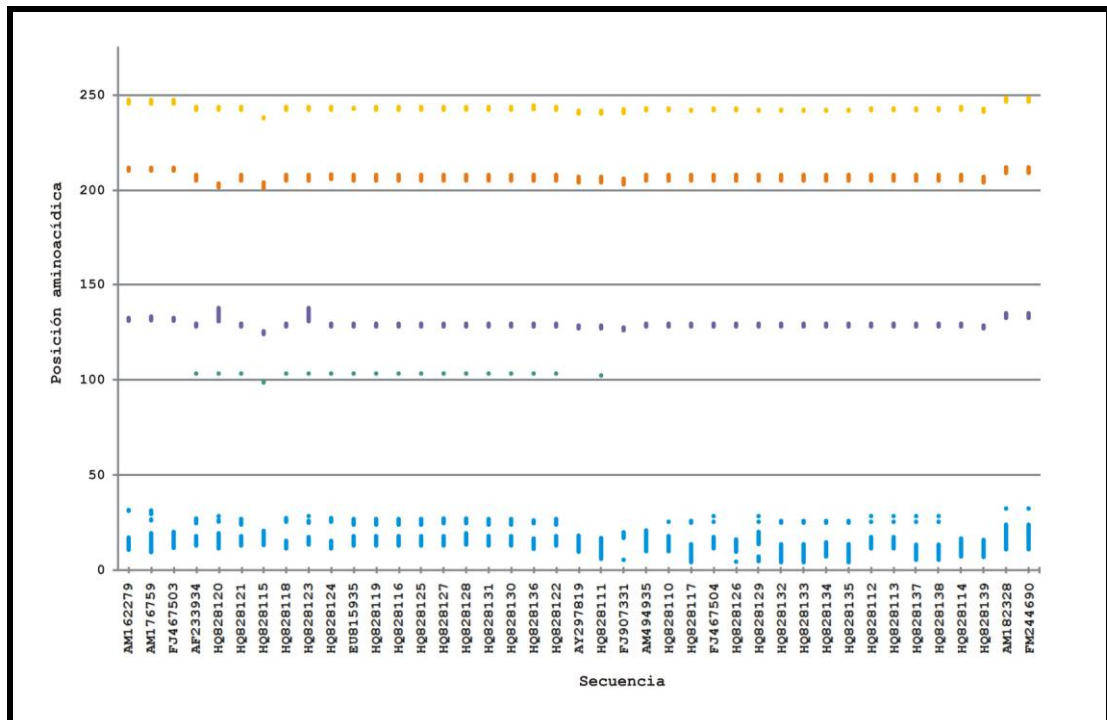


Figura 20. Representación de la ubicación de los epítopes lineales predichos por Bepipred. Con colores similares, epítopes considerados equivalentes entre las secuencias. En ordenadas, posición en la secuencia aminoacídica.

V.4 DISCUSIÓN

En este capítulo, se logró la clonación y secuenciación de la CP completa de los ampelovirus presentes en 21 muestras de vid infectadas con LD. El análisis de estas secuencias permitió confirmar la ocurrencia de dos nuevas especies virales en Argentina (GLRaV-9 y GLRaV-6), lo que fué inferido en el capítulo anterior en base a datos serológicos.

Los primers diseñados demostraron tener un amplio espectro de detección al amplificar eficientemente *in-vitro* tres de las supuestas especies de ampelovirus del subgrupo I (GLRaV-5, 9 y 6). La baja tasa de mismatch *in silico* cuando la secuencia de los primers fue confrontada con las secuencias del resto de los ampelovirus del subgrupo I, sugieren que podrían detectar eficientemente a miembros de los grupos de GLRaV-4, -Pr y Carn.

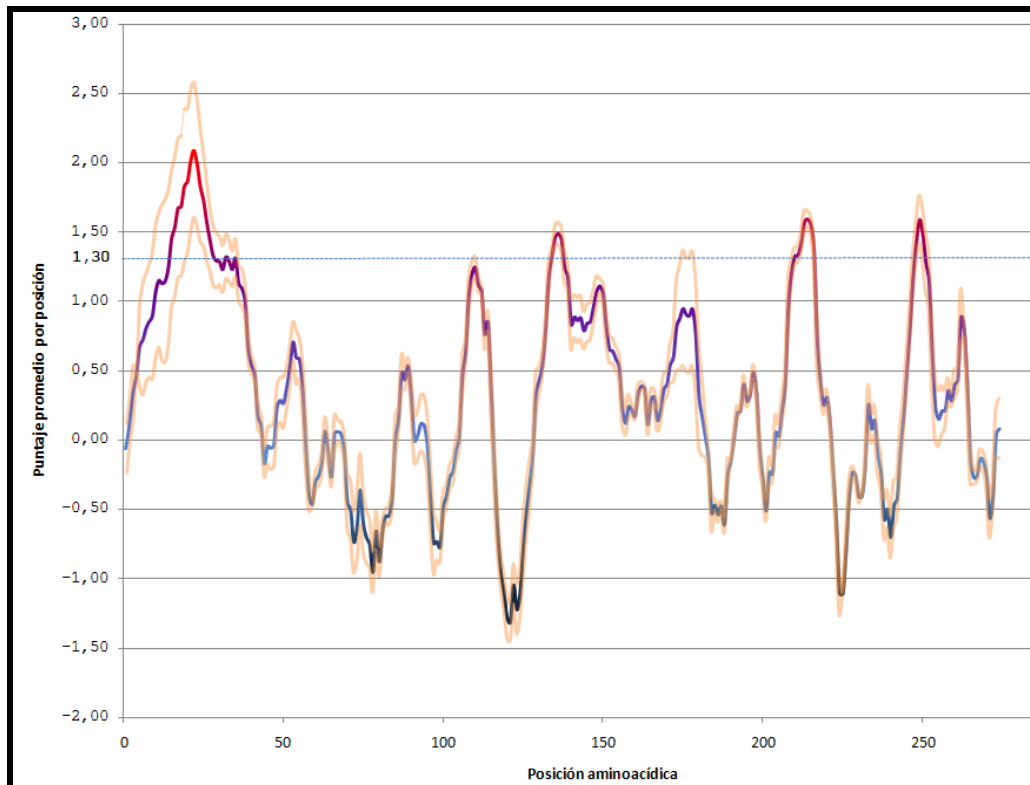


Figura 21. Representación de los valores promedio para todas las secuencias consideradas, obtenidos por Bepipred. Las líneas naranjas representan un rango en torno al promedio de +/- una desviación estándar para cada posición. El valor de umbral de 1.30 utilizado para definir los epítopes corresponde a la línea azul.

Las secuencias obtenidas mostraron un alto grado de conservación del tamaño de la CP (269 aa), salvo tres excepciones en las que se observaron:

- La delección de un codón y la mutación en el codón de terminación TGA → TGG, generando una CP de 271 aa (clon Verduzco A5)
- La delección de cuatro codones (clon Colgadera1).
- La delección de un codón (Clon SangioC1)

En todos los casos, las delecciones no modificaron el marco de lectura, permitiendo traducir una proteína del rango de tamaño reportado para los ampelovirus de vid del subgrupo I (268 – 273 aa).

La alta tasa de variabilidad observada en el extremo N-terminal (Figura 16 y Tabla XV) permitió postular el hecho de que la CP estuviera sometida a algún tipo de presión de selección que haya conducido la evolución de estas especies virales. Con este objeto, se realizó un análisis de presión de selección. Como paso previo necesario a este, el conjunto de datos en estudio (41 alineamientos de codones de ampelovirus del subgrupo I) fue sometido a un análisis de ocurrencia de recombinación, infiriéndose un evento recombinatorio. Sobre este punto se volverá más adelante. A partir del posible punto de recombinación, se generaron dos subsets de datos, uno correspondiente al extremo N-terminal variable (primeros 70 codones) y otro al extremo C-terminal conservado. Para determinar la ocurrencia de presión de selección positiva (o diversificante) o negativa (o purificante) se utilizaron tres programas distintos (SLAC, FEL y REL). El tamaño del conjunto de datos analizado (41 secuencias) no permitió escoger uno solo de ellos, ya que por ejemplo, FEL o SLAC presentan menor tasa de error que REL con conjuntos de datos pequeños (8 muestras), pero con conjuntos mayores a 64 todos se comportan de manera similar (Kosakovsky Pond and Frost 2005). El análisis detallado de los resultados obtenidos por los tres métodos, no permitió sospechar la ocurrencia de falsos positivos tanto en el caso de los sitios identificados bajo presión positiva como negativa (esto es, valores de d_N/d_S contradictorios para una determinada posición entre los tres métodos). Los resultados obtenidos (8 sitios bajo presión positiva en el extremo N-terminal y el 100% de los sitios bajo presión negativa en el extremo C-terminal) explican el grado de variabilidad mostrado a lo largo de la CP. Estudios previos sobre este grupo de especies virales reportaron la ocurrencia de presión de selección purificante en la CP, pero no lograron identificar selección diversificante (Maliogka *et al.* 2008a). En el trabajo de Maliogka *et al.*, solo se consideró una región de 178 aminoácidos del extremo C-terminal (correspondiente a uno de los dos subsets analizados en el presente estudio). Los valores de d_N/d_S global obtenidos en el presente trabajo para la CP entera (0,110 y 0,0134 por SLAC y REL respectivamente) están en el

rango del determinado por Maliogka *et al* (0,089 por FEL), pero al desglosar la CP, los valores de d_N/d_S son notablemente diferentes entre los dos extremos de la CP (Tabla XVII).

En adición a su función estructural, la CP de los virus vegetales está involucrada en la especificidad para con el vector. En el caso de los ampelovirus asociados a LD, se conocen que son transmitidos con distinta eficiencia por cochinillas harinosas (de Borbon *et al.* 2004; Fuchs *et al.* 2009; Tsai *et al.* 2010). Una mutación que provea una ventaja en la afinidad con el vector puede conferir una enorme ventaja con respecto a la población original. Esto podría explicar la ocurrencia de sitios con presión de selección positiva en la parte externa de la CP. En contraste la región C-terminal muy conservada puede ser resultado de requerimientos de conformación estructural de la CP o fuertes requisitos de interacción de la CP en el ciclo de replicación del virus en la planta. El mismo perfil evolutivo (una región N-terminal variable con sitios bajo presión de selección positiva) ha sido reportado en Bean yellow Mosaic Virus (Potyvirus) (Parrella and Lanave 2009). En esta especie, uno de los sitios identificado como seleccionado positivamente, forma parte de un motivo involucrado en la interacción virus-vector, siendo en consecuencia, crucial para su transmisibilidad. Sin embargo, la ocurrencia de sitios bajo presión de selección positiva en la CP de los virus vegetales no es común (Chare and Holmes 2004).

En general, los virus vegetales son generalistas para con su huésped, pero con una gran especificidad para con su vector. De hecho, de todos los virus transmitidos por algún vector, aproximadamente un 60% son transmitidos por una sola especie; mientras que menos de un 10% de las especies de virus vegetales infectan un solo huésped (Power 2008). Los ampelovirus asociados a LD parecen ser únicos entre los virus vegetales. Por ejemplo, GLRaV-3 solo infecta *Vitis spp*, pero es transmitido por al menos seis distintas especies vectoras. La significancia de estas observaciones en el estudio de los ampelovirus puede ser definida por un estudio exhaustivo de

la eficiencia de transmisión de diversas variantes genéticas de una misma especie viral por medio de distintas especies vectoras.

El análisis filogenético de las secuencias, mostró un notable agrupamiento de las mismas. Los datos de secuencia de CP previos a este estudio eran escasos, con uno o dos ORF completamente secuenciado por cada uno de las posibles especies virales, no teniéndose suficiente información para definir la pertenencia a una u otra especie en base a la CP, por lo que se sugería utilizar como criterio taxonómico, el análisis filogenético de la HSP70h. Inicialmente las especies del subgrupo I fueron definidas por relaciones serológicas, por eso se intentó establecer las relaciones entre las CP de los virus en estudio. Las secuencias obtenidas permitieron una clara discriminación entre supuestas especies virales en el árbol filogenético consenso obtenido por ML, soportando con altos valores de bootstrap, la existencia de al menos 5 variantes genéticas distintas dentro del subgrupo I: GLRaV-4, -5, -9, -6, -Pr. GLRaV-Carn posiblemente sea una nueva especie como postulan Abou Ghanem Sabanadzovic *et al.* (2010), pero un mayor número de secuencias de aislamientos relacionados serian necesarios para confirmar esto. Los valores de identidad aminoacídica entre las especies identificadas en este trabajo (GLRaV-5, -9 y -6) son adecuados para definir especies de acuerdo a los criterios vigentes (diferencias menores a 10% de identidad aminoacídica para aislamientos, y mayores a 10% para especies). Debe considerarse en este contexto, que este umbral se modifica a 20% para el caso de algunas especies altamente variables. Recientemente, Abou Ghanem Sabanadzovic *et al.* (2012) publicaron el análisis genético de GLRaV-4 y -6. En base a las características de los genomas completos recientemente disponibles (estructura, número de ORF, tamaño), vectores, tamaño de la partícula viral y de la CP, proponen considerar a todo el grupo de especies del subgrupo I como una sola especie. Esto esta de acuerdo con lo determinado en esta tesis, como se expresa a continuación.

Considerando solamente las secuencias provenientes de muestras analizadas por WB, se puede realizar un análisis particular. En el análisis de predicción de epítopes, se determinó para estas secuencias, la existencia de un epítotope con un alto valor de antigenicidad entre los residuos 2 y 27. Cuando estos fragmentos se utilizaron por separado para generar un árbol de ML, se obtiene el presentado en la figura 22, el cual no difiere substantivamente del árbol ML de la figura 19, observándose la agrupación de los conjuntos GLRaV-5, -6 y -9. Al confrontar a este los resultados de WB de las purificaciones obtenidas de las plantas, se obtienen relaciones esperadas y otras no tanto. En el caso de las secuencias provenientes de los cvs Carmenere, Foster, Sacy, Cabernet Sauvignon D33, Cabernet Sauvignon M1 y Aspirant Bouchet, las cuales en la Tabla XI fueron estimadas como GLRaV-6, la filogenia de las secuencias derivadas de ellas concuerda con la presunción basada en WB. Lo mismo sucede para el cv Shuyler. En el caso de los cvs Colgadera y MC, los cuales fueron relacionados con GLRaV-6/De y -5 respectivamente por WB, resultaron presentar una infección mixta con ambas especies. El análisis de WB de la muestra Masse Camp, reveló una fuerte reacción con el anticuerpo Mab 3-3, y una débil reacción con todos los otros monoclonales, incluyendo el Mab 36-117 (GLRaV-6). Una diferencia en la acumulación de partículas virales entre las dos variantes genéticas virales podría conducir a este comportamiento, mientras que una diferencia más extrema podría inducir el comportamiento en WB del cv Colgadera (ausencia de reacción contra Mab 3-3). Dos muestras que no presentaron reacción con ningún anticuerpo monoclonal pero sí con los antisueros (Tockai y Tamares), generaron secuencias que se agruparon con GLRaV-5 y GLRaV-6 respectivamente. Esto podría deberse a modificaciones menores en la región de los epítopes reconocidos por los Mabs correspondientes. Se puede observar en el árbol de la figura 22 que si bien se agrupan en los grupos mencionados, están distantes de las secuencias derivadas de plantas con fuerte reacción serológica contra los Mabs 3-3 (GLRaV-5) y 36-117 (GLRaV-6). La secuencia derivada del cv Cabernet Sauvignon LR50 (la cual se

presumió infectada por GLRaV-5 por su reacción contra Mab 8-2) se agrupa (aunque en forma distante de las que presentan reacción neta con el Mab homólogo) con el conjunto de GLRaV-6. Cabe mencionar que el epítotope predicho sobre esta secuencia aminoacídica presenta un aspecto que se destaca del resto de las secuencias del mismo grupo (Figura 20, secuencia HQ828123), pudiendo esto ser responsable de esa reacción serológica incongruente. La secuencia obtenida del cv. Sangiovesse Fiano, como se esperaba, no se agrupó con ninguno de los dos grupos principales (GLRaV-5 o -6/De), y se mantuvo conformando claramente un tercer grupo (el cual resulta ser GLRaV-9, Figura 19) de acuerdo a los resultados de WB. Finalmente la secuencia obtenida del cv. Plavai presenta una clara incongruencia entre los datos serológicos y moleculares, ya que a partir de los resultados de WB presentaba un claro perfil de GLRaV-6, pero la secuencia derivada de la misma presentó un agrupamiento con GLRaV-5. En esta muestra podría existir una infección mixta no detectada por RT-PCR, o una variabilidad en la secuencia aminoacídica responsable de este comportamiento irregular (similar a lo manifestado para el cv Cabernet Sauvignon LR50). En términos generales, puede considerarse que el uso de los anticuerpos monoclonales permitiría una adecuada asignación taxonómica, pero la ocurrencia de infecciones mixtas y la presencia de resultados de secuenciación incongruentes con los datos serológicos, pone de manifiesto su falta de aplicabilidad práctica.

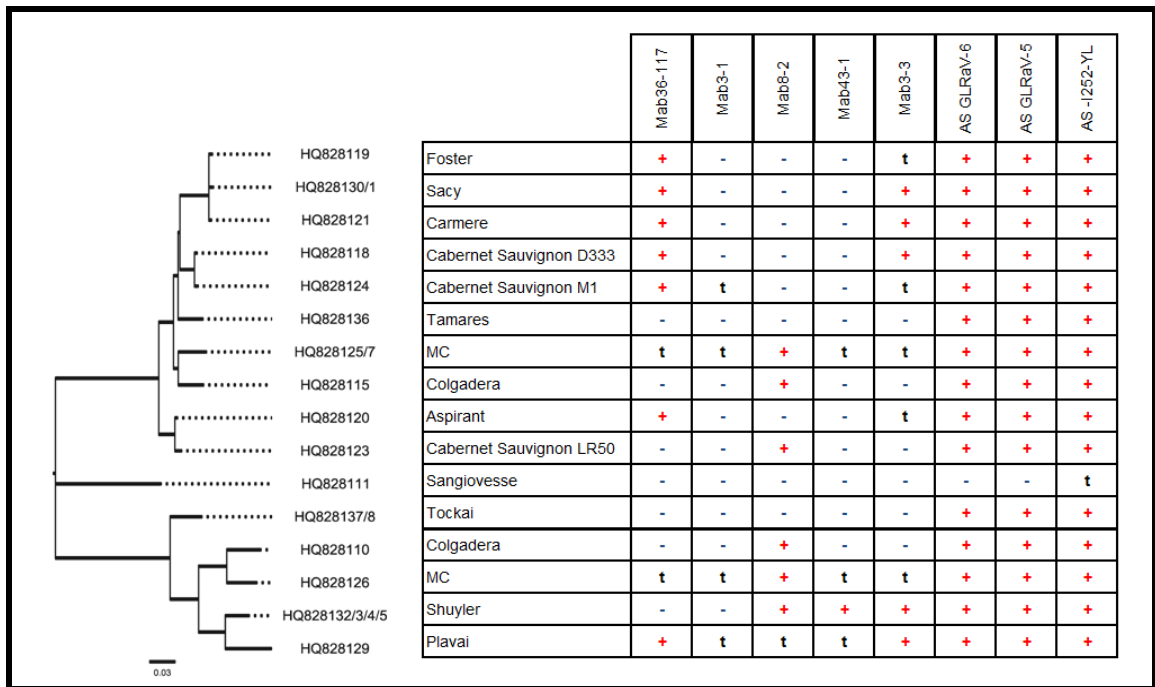


Figura 22. Confrontación de los resultados de WB y la filogenia estimada por ML a partir de las secuencias aminoacídicas de los residuos 2-27 derivadas de las plantas correspondientes. Reacción positiva: +. Reacción negativa: -. Reacción heteróloga: t

Los valores de distancia genética dentro de cada grupo determinados por Maximum Composite Likelihood para GLRaV-5 fueron similares a los de GLRaV-3 (0.059 y 0.072 respectivamente), mientras que los de GLRaV-6 fueron un poco menores a los de GLRaV-2(0.111 y 0.118 respectivamente). Cabe mencionar que GLRaV-2 es considerado el GLRaV con mayor variabilidad genética (Martelli 2009; Bertazzon *et al.* 2010; Jarugula *et al.* 2010). Valores de distancia genética superiores a 0.100 han sido obtenidos para Rupestris stem pitting associated virus (Alabi *et al.* 2010), un virus considerado como muy variable. Esto indica que GLRaV-6 puede ser un grupo genético con un grado de variabilidad mayor a otros ampelovirus asociados a LD. Los valores obtenidos para el resto de las especies deben ser considerados con cautela, por la baja cantidad de secuencias desde las que se genera la información (3 secuencias solamente para GLRaV-4, y dos para GLRaV-9 y – Pr).

Respecto a la topología del árbol obtenido por ML del ORF de la CP, si bien se observa una clara discriminación de las supuestas especies virales, el ordenamiento no es el obtenido previamente en los estudios filogenéticos de la HSP70h (Figura 23A) (Maliogka *et al.* 2008a). En la estructura reportada por Maliogka *et al.*, GLRaV-5 y GLRaV-6 parecen ser especies más cercanas entre sí que GLRaV-9, mientras que en análisis realizado en este capítulo, GLRaV-5 y -9 están más relacionadas entre sí, y distantes a -6 (Figura 23 C). Esto mismo puede desprenderse del análisis realizado sobre la CP por Maliogka *et al.* con pocas secuencias (Figura 23 B). Esta discrepancia, dado los altos valores de bootstrap que soportan ambos árboles, es explicada por el evento de recombinación inferido por GARD. Los árboles generados por GARD (Figura 17), muestran en el extremo N-terminal un topología cercana a la presentada por Maliogka *et al.* para la HSP70h, mientras que el extremo C-terminal GLRaV-9 esta más relacionada a los valores de identidad aminoacídicos de ese extremo entre GLRaV-5 y -9.

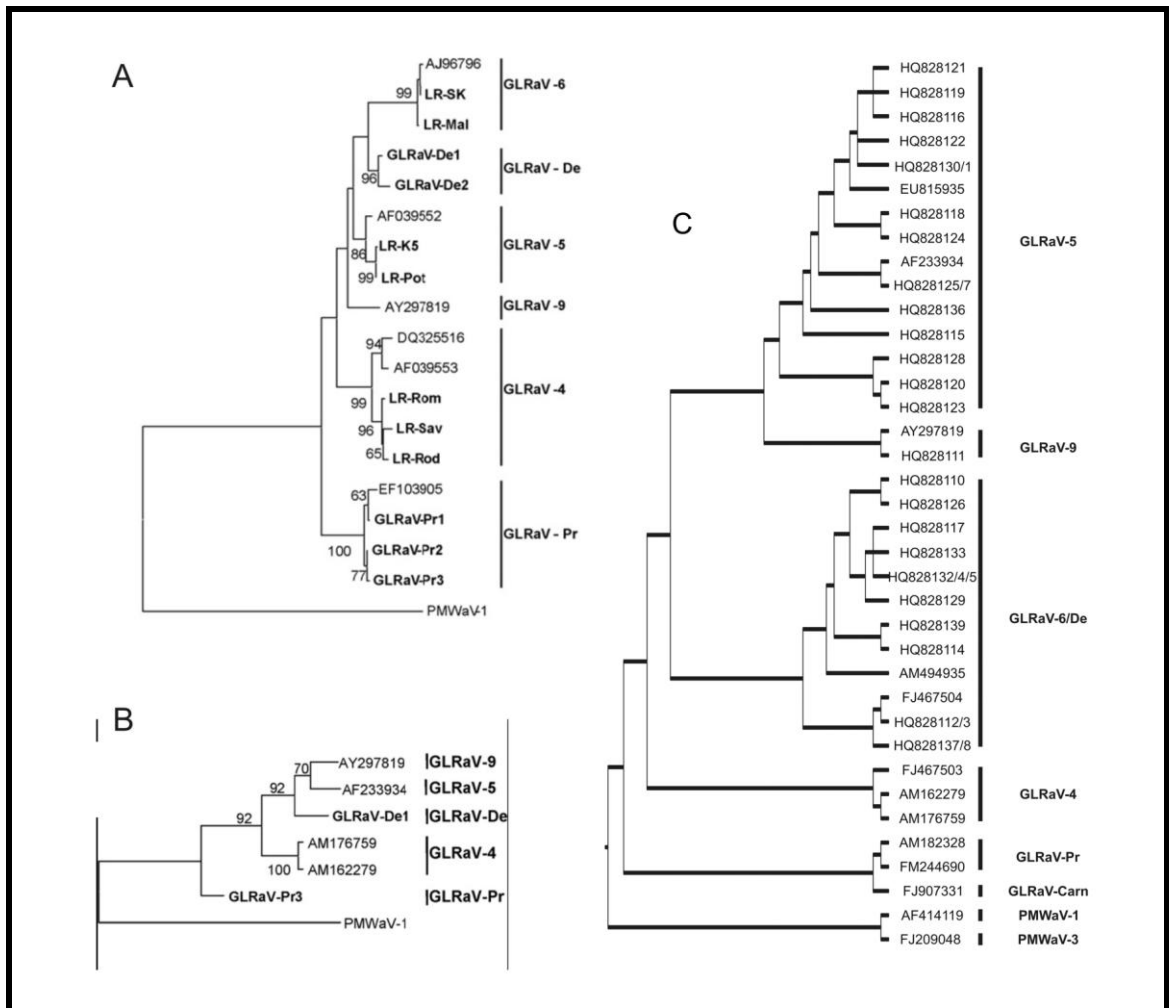


Figura 23. Árboles filogenéticos obtenidos por ML; A y B, extraídos de Maliogka et al. (2008a).; C generado en este trabajo. A) Considerando secuencias parciales de HSP70h. B) Considerando CP completa. C) Considerando CP completa

Al confrontar los resultados de los análisis de variabilidad, presión de selección y predicción de epítopes, una interesante correlación se hace evidente. La región mas inmunogénica de la CP de los ampelovirus, es el extremo N-terminal, el más variable y con mayor presión de selección diversificante (Figura 24)

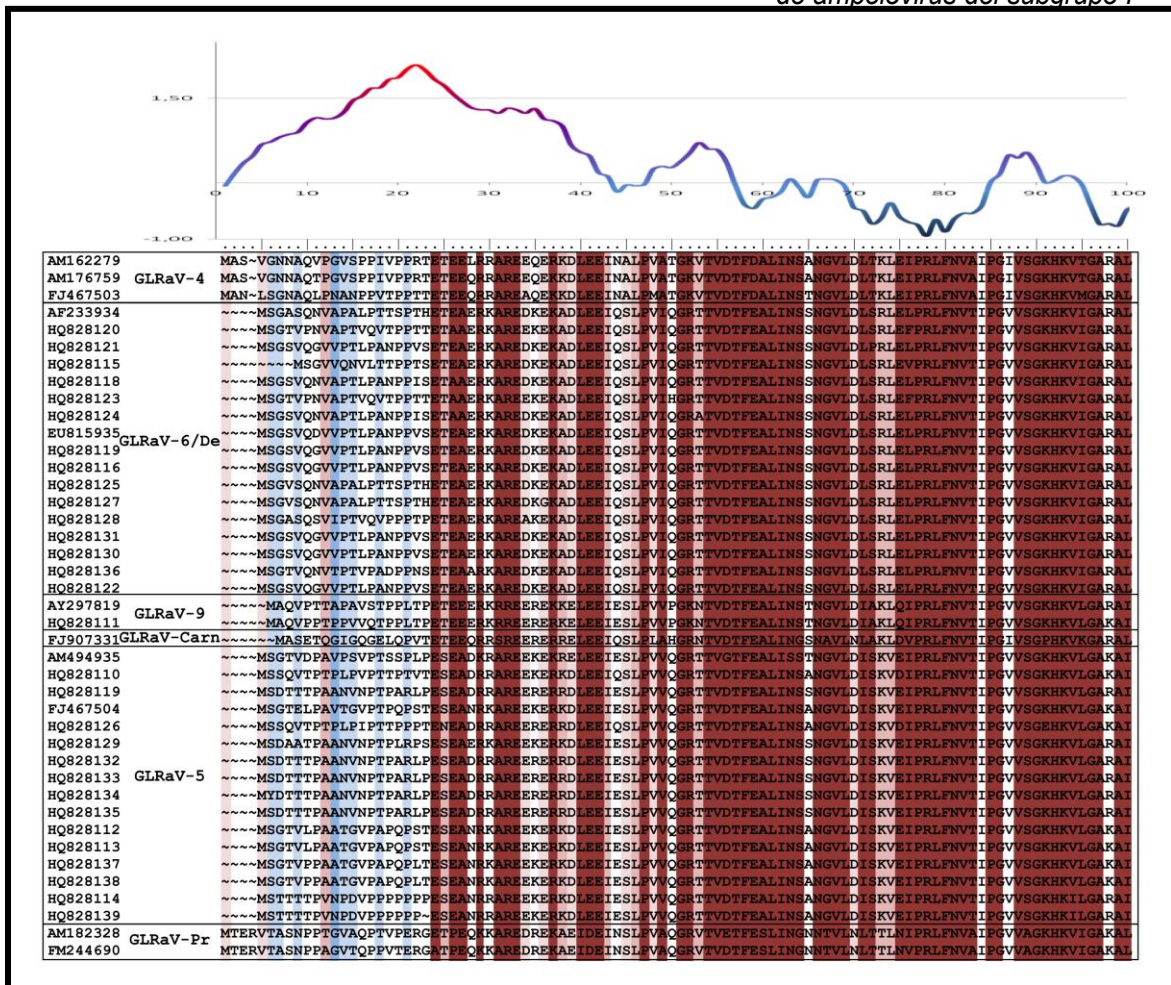


Figura 24. Representación de los valores medios obtenidos por Bepipred confrontados con los sitios inferidos como bajo distinto tipo de presión de selección en los primeros 100 aminoácidos de la CP de los ampelovirus analizados.

La mayoría de los reactivos serológicos disponibles para la caracterización de los ampelovirus del subgrupo I son anticuerpos monoclonales (Gugerli 2009) y algunos poseen buena reactividad contra la CP desnaturalizada en Western Blot (lo que se ha observado en el capítulo 4 de esta tesis). Por esto es muy probable que reconozcan epítopes lineales. Considerando que durante el proceso de inmunización los antígenos fueron aplicados en forma nativa, estos epítopes posiblemente estén ubicados en la superficie del virión. En adición a las consecuencias de esto en la afinidad con el vector (discutido anteriormente) hay implicancias inmunológicas de

significancia. Podríamos considerar que la región mas inmunogénica (según el análisis de predicción de epítopes lineales) sería un epítopo lineal ubicado en el extremo N-terminal, siendo los anticuerpos dirigidos a estos epítopes no adecuados para una asignación taxonómica a nivel de especie. Esta aseveración se hace considerando que el nivel de identidad aminoacídica (entre secuencias pertenecientes a un mismo grupo) encontrado en este estudio en esa región varía entre 21% y 100% para GLRaV-5 y 15%-100% para GLRaV-6. Sin embargo, estos anticuerpos podrían ser muy útiles para discriminación de aislamientos. Esta suposición debería ser confirmada mediante una profunda correlación entre datos serológicos y moleculares. Sin embargo la cruce de los resultados obtenidos en este estudio apunta en esa dirección (Figura 22). Por el contrario, los anticuerpos presentes en el set genérico de ELISA anti GLRaV-4-9 utilizado en este trabajo, parece estar dirigidos contra epítopes conformacionales, ya que no presentan reacción en WB (Besse *et al.* 2009). Estos epítopes deberían estar muy conservados, y ubicados posiblemente en el extremo C-terminal. Debido a que no hay sistemas efectivos para la predicción de epítopes conformacionales desde la estructura primaria de las proteínas, este punto resulta sin respuesta por el momento.

En conclusión, basado en el número de secuencias consideradas, el origen geográfico diverso, los valores de bootstrap del árbol de ML, los niveles de distancia genética y los niveles de identidad aminoacídica, podemos inferir con la información disponible y generada para los ampelovirus del subgrupo I, que las secuencias disponibles representan cepas divergentes de una especie muy variable. Finalmente, respecto a GLRaV-5, -6 y -9, en base a la información previa y a los datos obtenidos en esta tesis, concluimos que estas secuencias pertenecen a una misma especie, proponiendo para ella el nombre de GLRaV-5.

CONCLUSIÓN GENERAL

En este trabajo de tesis se intentó realizar un aporte significativo a la etiología de LD en la Argentina. Como fruto de esto se identificaron por primera vez en el país tres supuestas nuevas especies virales asociadas a la enfermedad (GLRaV-5, -6 y -9) mediante el uso de una técnica de RT-PCR, al menos, tan eficiente como la combinación de dos kits de diagnóstico basados en DAS-ELISA.

El análisis serológico mediante Western Blot de los aislamientos virales identificados, no permitió un resultado conclusivo al momento de asignarlos taxonómicamente.

El análisis de las secuencias de la cápside protéica permitió inferir una filogenia que soporta la taxonomía propuesta por diversos autores con 6 linajes/especies bien definidos dentro del subgrupo I de los ampelovirus

Se logró determinar que la alta variabilidad presente en el extremo N-terminal de la CP, posiblemente derivada de una presión de selección diversificante, conjuntamente con la alta antigenicidad de esa región pueden explicar la reactividad cruzada de diversos anticuerpos monoclonales desarrollados en los últimos años.

Finalmente, la conjunción de los análisis filogenéticos, evolutivos, de similitud de secuencia y serológicos, sugieren que el conjunto de aislamientos virales identificados en el país pueden constituir tres linajes genéticos de una sola especie viral altamente variable, para la que se propone el nombre de GLRaV-5.

REFERENCIAS

- Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., S.Sabanadzovic, M.A.Castellano, D.Boscia and G.P.Martelli (2000). "Properties of a new isolate of grapevine leafroll-associated virus 2." *Vitis* 39(3): 119-121.
- Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., S.Sabanadzovic, J.K.Uyemoto, D.Golino and A.Rowhani (2010). "A putative new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease." *Archives of Virology* 155(11): 1871-1876.
- Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., S. Sabanadzovic, P. Gugerli and A. Rowhani (2012). "Genome organization, serology and phylogeny of Grapevine leafroll-associated viruses 4 and 6: Taxonomic implications." *Virus Research* 163(1): 120-128.
- Agranovsky, A.A., V.P.Boyko, A.V.Karasev, E.V.Koonin and V.V.Dolja (1991). "Putative-65 kDa protein of Beet Yellows Closterovirus is a homolog of HSP70 heat-shock proteins." *Journal of Molecular Biology* 217(4): 603-610.
- Alabi, O.J., R.R.Martin and R.A.Naidu (2010). "Sequence diversity, population genetics and potential recombination events in grapevine rupestris stem pitting-associated virus in Pacific North-West vineyards." *Journal of General Virology* 91(1): 265-276.
- Alkowni, R., A.Rowhani, S.Daubert and D.Golino (2004). "Partial characterization of a new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease." *Journal of Plant Pathology* 86(2): 123-133.
- Angelini, E., N.Bertazzon and M.Borgo (2004). "Diversity among grapevine leafroll-associated virus 2 isolates detected by heteroduplex mobility assay." *Journal of Phytopathology* 152(7): 416-422.
- Bertazzon, N., M.Borgo, S.Vanin and E.Angelini (2010). "Genetic variability and pathological properties of Grapevine Leafroll-associated Virus 2 isolates." *European Journal of Plant Pathology*: 1-13.
- Besse, S., W.Bitterlin and P.Gugerli (2009). Development of an ELISA for simultaneous detection of Grapevine leafroll associated virus -4, -5, -6, -7 and -9. Extended abstracts 16th Meeting of ICVG. Dijon, France.
- Bol, J.F. (2008). "Role of capsid proteins" *En Plant Virology Protocols. Methods in Molecular Biology* 451: 21-31.
- Boscia, D., C.Greif, P.Gugerli, G.P.Martelli, B.Walter and D.Gonsalves (1995). "Nomenclature of Grapevine Leafroll-associated putative Closteroviruses." *Vitis* 34(3): 171-175.
- Buzkan, N., S.Karadag, A.Kaya, S.Baloglu, A.Minafra and Y.Ben-Dov (2010). "First Report of the Occurrence of Grapevine leafroll-associated virus-5 in Turkish Vineyards." *Journal of Phytopathology* 158(6): 448-449.
- Callaway, A., D.Giesman-Cookmeyer, E.T.Gillock, T.L.Sit and S.A.Lommel (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 39: 419-460.
- Castellano, M.A., G.P.Martelli and V.Savino (1983). "Virus-like particles and ultrastructural modifications in the phloem of leafroll-affected grapevines." *Vitis* 22: 23.
- Clark, M.F. and A.N.Adams (1977). "Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant-viruses." *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Cucchi, N.J.A. and V.C.Becerra (2009). *Manual de Tratamientos Fitosanitarios para Cultivos de Clima Templado Bajo Riego*. Publicaciones Regionales INTA.
- Chare, E.R. and E.C.Holmes (2004). "Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission." *Journal of General Virology* 85: 3149-3157.
- Choueiri, E., D.Boscia, M.Digiario, M.A.Castellano and G.P.Martelli (1996). "Some properties of a hitherto undescribed filamentous virus of the grapevine." *Vitis* 35(2): 91-93.
- de Borbon, C.M., O.Gracia and G.S.Gómez Talquenca (2004). "Mealybugs and grapevine leafroll-associated virus 3 in vineyards of Mendoza, Argentina." *American Journal of Enology and Viticulture* 55(3): 283-285.
- Dolja, V.V., J.F.Kreuze and J.P.T.Valkonen (2006). "Comparative and functional genomics of closteroviruses." *Virus Research* 117(1): 38-51.
- Dovas, C.I. and N.I.Katis (2003). "A spot multiplex nested RT-PCR for the simultaneous and generic detection of viruses involved in the aetiology of grapevine leafroll and rugose wood of grapevine." *Journal of Virological Methods* 109(2): 217-226.

- Elbeaino, T., F.Numeric, M.Digiario, S.Sabanadzovic and G.P.Martelli (2009). "Partial characterisation of a Grapevine Leafroll-associated Virus isolated from an infected Cypriot vine of cv. Mavro." *Journal of Plant Pathology* 91(2): 479-484.
- Faoro, F., R.Tornaghi, A.Fortusini and G.Belli (1981). "Association of a possible closterovirus with grapevine leafroll in northern Italy." *Rivista di Patologia Vegetale* 17(3-4): 183-189.
- Fazeli, C.F., N.Habili and M.A.Rezaian (1998). "Efficient cloning of cDNA from grapevine leafroll-associated virus 4 and demonstration of probe specificity by the viral antibody." *Journal of Virological Methods* 70(2): 201-211.
- Fuchs, M., P.Marsella-Herrick, G.M.Loeb, T.E.Martinson and H.C.Hoch (2009). "Diversity of ampeloviruses in mealybug and soft scale vectors and in grapevine hosts from leafroll-affected vineyards." *Phytopathology* 99(10): 1177-1184.
- Gambley, C.F., V.Steele, A.D.W.Geering and J.E.Thomas (2008). "The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease." *Australasian Plant Pathology* 37(2): 95-105.
- García Arenal, F. and A.Fraile (2008). "Questions and concepts in plant virus evolution: a historical perspective." En *Plant Virus Evolution*. Ed. M. Roossinck. Berlin, Springer Verlag.
- Gatica, M., B.Dubos and P.Larignon (2000). "The "hoja de malvón" grape disease in Argentina." *Phytopathologia Mediterranea* 39(1): 41-52.
- Goheen, A.C. (1970). "Grape Leafroll". En *Virus diseases of small fruits and grapevines*. Ed. N. W. Frazier *et al.* Berkeley, California, University of California, Division of Agricultural Sciences.
- Gómez Talquenca, G.S., O.Gracia, S.García Lampasona and O.Grau (2003). A young grafted vine decline syndrome in Argentina vineyards. Proceedings of XIV Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, Bari, Italia.
- Good, X. and J.Monis (2001). "Partial genome organization, identification of the coat protein gene, and detection of Grapevine leafroll-associated virus-5." *Phytopathology* 91(3): 274-281.
- Goszczyński, D.E., G.G.F.Kasdorf, G.Pietersen and H.Van Tonder (1996). "Detection of two strains of grapevine leafroll-associated virus 2." *Vitis* 35(3): 133-135.
- Gracia, O., G.S. Gómez Talquenca, E.Vega and P.A.Worlock (2003). Present status of grapevine sanitary selection in Argentina. . Proceedings of XIV Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine., Bari, Italy.
- Gracia, O., E.Vega and P.A.Worlock (1997). Detección de virosis de la vid en Mendoza (Argentina) con la técnica ELISA. XXII Congrès de la vigne et du vin, Buenos Aires.
- Gugerli, P. (2009). 25 years of serological identification of Grapevine Leafroll-associated Viruses: antiserum and monoclonal antibodies to GLRaV-1 to GLRaV-9. Extended abstracts 16th Meeting of ICVG.
- Gugerli, P., J.J.Brugger and R.Bovey (1984). "L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immunoenzymatique pour le diagnostic rapide." *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 16: 299-304.
- Gugerli, P., J.J.Brugger and M.E.Ramel (1997). "Identification immuno-chimique du 6eme virus associé à la maladie de l'enroulement de la vigne et amelioration des techniques de diagnostic pur la sélection sanitaire en viticulture." *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 29(3):137-141.
- Gugerli, P. and M.E.Ramel (1993). Grapevine leafroll associated virus II analyzed by monoclonal antibodies. Extended abstracts 11th Meeting of ICVG, Montreaux, Switzerland.
- Gugerli, P., S.Rigotti, M.E.Ramel, N.Habili, A.Rowhani, W.Bitterlin and S.Besse (2009). Production of monoclonal antibodies to Grapevine Leafroll associated Virus 9 (GLRaV-9). Extended abstracts 16th Meeting of ICVG.
- Guidoni, S., F.Mannini, A.Ferrandino, N.Argamante and R.Di Stefano (1997). "The effect of grapevine leafroll and rugose wood sanitation on agronomic performance and berry

- and leaf phenolic content of a nebbiolo clone (*Vitis vinifera* L.)." *American Journal of Enology and Viticulture* 48(4): 438-442.
- Hu, J., D.Gonsalves, D.Boscia and S.Namba (1990a). "Use of monoclonal antibodies to characterize Grapevine Leafroll associated Closterovirus." *Phytopathology* 80: 920-925.
- Hu, J.S., D.Gonsalves and D.Teliz (1990b). "Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease." *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 128(1):1-14.
- Hull, R. (2002). *Plant virology*. London, Academic Press.
- INV (2008). *Síntesis Básica de Estadística Vitivinícola Argentina. Años 1991 a 2007. Cosecha y elaboración 2008*. Mendoza.
- Jarugula, S., O.J.Alabi, R.R.Martin and R.A.Naidu (2010). "Genetic Variability of Natural Populations of Grapevine leafroll-associated virus 2 in Pacific Northwest Vineyards." *Phytopathology* 100(7): 698-707.
- Karasev, A.V.(2000). "Genetic diversity and evolution of closteroviruses." *Annual Review of Phytopathology* 38: 293-324.
- Kominek, P., M.Glasa and M.Bryxiova (2005). "Analysis of the molecular variability of Grapevine leafroll-associated virus 1 reveals the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines." *Virus Genes* 31(3): 247-255.
- Kosakovsky Pond, S.L. and S.D.W.Frost (2005). "Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection." *Molecular Biology and Evolution* 22(5): 1208-1222.
- Kosakovsky Pond, S.L., D.Posada, M.B.Gravenor, C.H.Woelk and S.D.W.Frost (2006). "GARD: A genetic algorithm for recombination detection." *Bioinformatics* 22(24): 3096-3098.
- Kryazhimskiy, S., G.A.Bazykin and J.Dushoff (2008). "Natural selection for nucleotide usage at synonymous and nonsynonymous sites in influenza A virus genes." *Journal of Virology* 82(10): 4938-4945.
- Lanza Volpe, M., S.Gómez Talquenca, E.Engel and O.Gracia (2010). "Incidence of Grapevine Leafroll Associated Viruses -1, -2, and -3 in Mendoza vineyards." *Tropical Plant Pathology* 35(6): 377-380.
- Lanza Volpe, M., O.Gracia and S.Goméz Talquenca (2009). RFLP analysis of RT-PCR products to evaluate the genetic variability of CP ORF in GLRaV-2 isolates. Extended abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, France,.
- Lee, J.M. and R.R.Martin (2009). "Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and-3) on the fruit composition of Oregon *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir: Phenolics." *Food Chemistry* 112(4): 889-896.
- Little, A., C.F.Fazeli and M.A.Rezaian (2001). "Hypervariable genes in Grapevine leafroll associated virus 1." *Virus Research* 80(1-2): 109-116.
- Lole, K.S., R.C.Bollinger, R.S.Paranjape, D.Gadkari, S.S.Kulkarni, N.G.Novak, R.Ingersoll, H.W.Sheppard and S.C.Ray (1999). "Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C- infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination." *Journal of Virology* 73(1): 152-160.
- Maliogka, V.I., C.I.Dovas and N.I.Katis (2008a). "Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the Ampelovirus genus." *Virus Research* 135(1): 125-135.
- Maliogka, V.I., C.I.Dovas and N.I.Katis (2008b). "Generic and species-specific detection of viruses belonging to an evolutionary distinct lineage within the Ampelovirus genus." *Journal of Virological Methods* 154(1-2): 41-47.
- Maliogka, V.I., C.I.Dovas, L.Lotos, K.Efthimiou and N.I.Katis (2009). "Complete genome analysis and immunodetection of a member of a novel virus species belonging to the genus Ampelovirus." *Archives of Virology* 154(2): 209-218.
- Martelli, G.P.(2009). *Grapevine Virology Highlights 2006-2009*. Extended abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, Francia.
- Martelli, G.P., A.A.Agranovsky, M.Bar-Joseph, D.Boscia, T.Candresse, R.H.A.Coutts, V.V.Dolja, B.W.Falk, D.Gonsalves, W.Jelkmann, A.V.Karasev, A.Minafra, S.Namba,

- H.J.Vetten, G.C.Wisler and N.Yoshikawa (2002). "The family Closteroviridae revised." *Archives of Virology* 147(10): 2039-2044.
- Martin, D.P., P.Lemey, M.Lott, V.Moulton, D.Posada and P.Lefevre (2010). "RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination." *Bioinformatics* 26(19): 2462-2463.
- Martínez, L.E., P.F.Cavagnaro, R.W.Masuelli and M.Zuñiga (2006). "SSR-based assesment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties." *Plant Science* 170: 1036-1044.
- Milne, R.G., M.Conti, D.E.Lesemann, G.Stellmach, E.Tanne and J.Cohen (1984). "Closterovirus-like particles of two types associated with diseased grapevines." *Phytopathol.Z.* 110: 360.
- Monis, J. and R.K.Bestwick (1997). "Serological detection of grapevine associated closteroviruses in infected grapevine cultivars." *Plant Disease* 81(7): 802-808.
- Muñoz, C., S.Gómez Talquenca, E.Oriolani and M.Combina (2010). "Genetic characterization of grapevine-infecting *Botrytis cinerea* isolates from Argentina." *Revista Iberoamericana de Micología* 27(2): 66-70.
- Nadal, J.(1968). *Virus de la vid*. Circular 24.
- Namba, S., S.Yamashita, Y.Doi and K.Yora (1979a). "A small spherical virus associated with the ajinashika disease of Koshu grapevine." *Annals of Phytopathological Society of Japan* 45: 70.
- Namba, S., S.Yamshita, Y.Doi, K.Yora, Y.Terai and R.Yano (1979b). "Grapevine Leafroll Virus, a Possible Member of Closterovirus." *Annals of Phytopathological Society of Japan* 45: 497-502.
- Nome, C.F., S.F.Nome, F.Guzmán, L.Conci and I.G.Laguna (2007). "Localization of Sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV) in synergic infection with Potyviruses in sweet potato." *Biocell* 31(1): 23-31.
- OIV (2010). *Nota de Coyuntura Mundial*. Marzo 2010.
- Pappu, H.R., S.S.Pappu, K.L.Manjunath, R.F.Lee and C.L.Niblett (1993). "Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant-virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(8): 3641-3644.
- Parrella, G. and C.Lanave (2009). "Identification of a new pathotype of Bean yellow mosaic virus (BYMV) infecting blue passion flower and some evolutionary characteristics of BYMV." *Archives of Virology* 154(10): 1689-1694.
- Peremyslov, V.V., I.A.Andreev, A.I.Prokhnevsky, G.H.Duncan, M.E.Taliansky and V.V.Dolja (2004). "Complex molecular architecture of beet yellows virus particles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(14): 5030-5035.
- Pizzuolo, P., G.Lucero and E.Oriolani (2008). Principales enfermedades que afectan a la canopia de vid en Mendoza, Argentina. 1º Congreso Argentino de Fitopatología, Córdoba, Argentina.
- Posada, D. and K.A.Crandall (1998). "Modeltest: testing the model of DNA substitution." *Bioinformatics* 14(9): 817-818.
- Posada, D. and K.A.Crandall (2001). "Selecting models of nucleotide substitution: An application to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)." *Molecular Biology and Evolution* 18(6): 897-906.
- Power, A. G. (2008). "Community ecology of plant viruses".En *Plant Virus Evolution*. Ed. M.Roossinck. Berlin Heidelberg, Springer - Verlag.
- Prosser, S.W., D.E. Goszczynski and B.Z.Meng (2007). "Molecular analysis of double-stranded RNAs reveals complex infection of grapevines with multiple viruses." *Virus Research* 124(1-2): 151-159.
- Riaz, S., A.Doligez, R.J.Henry and M.A.Walker (2007). "Grape." En *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Ed. C. Kole. Berlin, Springer Verlag.
- Rigotti, S., W.Bittterlin and P.Gugerli (2006). Production of monoclonal antibodies to Grapevine Leafroll associated Virus 7 (GLRaV-7). Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa.

- Rose, T.M., J.G.Henikoff and S.Henikoff (2003). "CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design." *Nucleic Acids Research* 31(13): 3763-3766.
- Rose, T.M., E.R.Schultz, J.G.Henikoff, S.Pietrokovski, C.M.McCallum and S.Henikoff (1998). "Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences." *Nucleic Acids Research* 26(7): 1628-1635.
- Routh, G., Y.P.Zhang, P.Saldarelli and A.Rowhani (1998). "Use of degenerate primers for partial sequencing and RT-PCR-based assays of grapevine leafroll-associated viruses 4 and 5." *Phytopathology* 88(11): 1238-1243.
- Saldarelli, P., P.Cornuet, E.Vigne, F.Talas, I.Bronnenkant, A.M.Dridi, P.Andret-Link, D.Boscia, P.Gugerli, M.Fuchs and G.P.Martelli (2006). "Partial characterization of two divergent variants of grapevine leafroll-associated virus 4." *Journal of Plant Pathology* 88(2): 203-214.
- Saldarelli, P., A.Rowhani, G.Routh, A.Minafra and M.Digiario (1998). "Use of degenerate primers in a RT-PCR assay for the identification and analysis of some filamentous viruses, with special reference to closteroviruses and vitiviruses of the grapevine." *European Journal of Plant Pathology* 104(9): 945-950.
- Savino, V.(1993). "Extraction of closterovirus from grapevine tissues." *En Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis.* Ed.G. P. Martell. Rome, FAO.
- Seddas, A., M.M.Haidar, C.Greif, C.Jacquet, G.Cloquemin and B.Walter (2000). "Establishment of a relationship between grapevine leafroll closteroviruses 1 and 3 by use of monoclonal antibodies." *Plant Pathology* 49(1): 80-85.
- Sforza, R., E.Boudon-Padiou and C.Greif (2003). "New mealybug species vectoring Grapevine leafroll-associated viruses-1 and-3 (GLRaV-1 and-3)." *European Journal of Plant Pathology* 109(9): 975-981.
- Swofford, D.L.(2000). PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Tanne, E., I.Sela, M.Klein and I.Harpaz (1977). "Purification and characterization of a virus associated with the grapevine leafroll disease." *Phytopathology* 67: 442.
- Tian, T., V.A.Klaassen, J.Soong, G.Wisler, J.E.Duffus and B.W.Falk (1996). "Generation of cDNAs specific to lettuce infectious yellows closterovirus and other whitefly-transmitted viruses by RT-PCR and degenerate oligonucleotide primers corresponding to the closterovirus gene encoding the heat shock protein 70 homolog." *Phytopathology* 86(11): 1167-1173.
- Thompson, J. R., M. Fuchs and K. L. Perry (2012). "Genomic analysis of Grapevine leafroll associated virus-5 and related viruses." *Virus Research* 163(1): 19-27.
- Tsai, C.-W., A.Rowhani, D.A.Golino, K.M.Daane and R.P.P.Almeida (2010). "Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: An analysis of virus-vector specificity." *Phytopathology* 100(8): 830-834.
- Valverde, R.A., S.T.Nameth and R.L.Jordan (1990). "Analysis of double-stranded-rna for plant-virus diagnosis." *Plant Disease* 74(3): 255-258.
- Walter, B. and R.Legin (1986). "Connaissances actuelles sur les viroses de l'enroulement de la vigne." *Le vigneron champenoise* 9: 436-446
- Wernersson, R. and A G.Pedersen (2003). "RevTrans: multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences." *Nucleic Acids Research* 31(13): 3537-3539.
- Wolpert, J.A. and E.P.Vilas (1992). "Effect of mild leafroll disease on growth, yield, and fruit maturity indexes of Riesling and Zinfandel." *American Journal of Enology and Viticulture* 43(4): 367-369.
- Zhang, Y.P., J.K.Uyemoto and B.C.Kirkpatrick (1998). "A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay." *Journal of Virological Methods* 71(1): 45-50.
- Zimmermann, D., P.Bass, R.Legin and B.Walter (1990). "Characterization and serological detection of 4 closterovirus-like particles associated with leafroll disease on grapevine." *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 130(3): 205-218.

Referencias

Zwickl, D. J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

ANEXOS

Anexo I. PROGRAMAS DE PCR Y PRIMERS UTILIZADOS

1. PROGRAMA CHP

Primer Sentido: CHP-S	GGTTTCGATTTYGGNACNAC	Tamaño Amplicón
Primer Antisentido: CHP-A	GGAAGTACCACCNCCNARRTC	600bp aprox
Desnaturalización Inicial	95°C	2'30"
Desnaturalización	95°C	30"
Hibridación	55.5°C	30"
Extensión	72°C	45"
Desnaturalización	95°C	30"
Hibridación	49.5°C	30"
Extensión	72°C	45"
Extensión Final	72°C	10'
Mantenimiento final	4°C	

2. PROGRAMA SALDARELLI 98

Primer Sentido: HSP-P-1	GGNTTAGANTTCGGNACNAC	Tamaño Amplicón
Primer Antisentido: HSP-P-2	AANCCNCCNCCNTGNAACT	600bp aprox
Desnaturalización Inicial	94°C	4'
Desnaturalización	94°C	30"
Hibridación	40°C	30"
Extensión	72°C	60"
Extensión Final	72°C	10'
Mantenimiento final	4°C	

3. PROGRAMA P1N6

Primer Sentido/ Antisentido: P1	GCCGGAGCTCTGCAGAATTC	Tamaño Amplicón Variable
Desnaturalización Inicial	95°C	4'
Desnaturalización	94°C	60"
Hibridación	55°C	2'
Extensión	72°C	3'

Mantenimiento final	4°C
---------------------	-----

4. PROGRAMA LR5-S/A

Primer Sentido: LR5-S	CCCGTGATACAAGGTAGGAC	Tamaño Amplicón	
Primer Antisentido: LR5-A	CAGACTTCACCTCCTGTT	610bp aprox	
Desnaturalización Inicial	94°C	3'	
Desnaturalización	94°C	30"	
Hibridación	62°C	45"	35 ciclos
Extensión	72°C	60"	
Extensión Final	72°C	5'	
Mantenimiento final	4°C		

5. PROGRAMA SL-S/C-HSP90

Primer Sentido: SL-S	GGTTTAAGTGCNTTTGTCACC	Tamaño Amplicón	
Primer Antisentido: C-HSP90	CAAATGACGACCCCATCCTT	1.320bp aprox	
Desnaturalización Inicial	95°C	2'30"	
Desnaturalización	95°C	30"	
Hibridación	55°C	45"	35 ciclos
Extensión	72°C	45"	
Extensión Final	72°C	15'	
Mantenimiento final	4°C		

6. PROGRAMA C-HSP91/C-CP

Primer Sentido: C-HSP91	GTTTGCTTCTGGACGTTGGT	Tamaño Amplicón	
Primer Antisentido: C-CP	AGCACACCGTTGAGCTATT	1.320bp aprox	
Desnaturalización Inicial	95°C	2'30"	
Desnaturalización	95°C	30"	
Hibridación	51°C	45"	35 ciclos
Extensión	72°C	50"	
Extensión Final	72°C	10'	
Mantenimiento final	4°C		

7. PROGRAMA C-HSP91/C-CP

Primer Sentido: C-HSP91	GTTTGCTTCTGGACGTTGGT	Tamaño Amplicón
-------------------------	----------------------	-----------------

Primer Antisentido: C-CP	AGCACACCGTTCGAGCTATT	1.320bp aprox
Desnaturalización Inicial	95°C	2'30"
Desnaturalización	95°C	30"
Hibridación	51°C	45"
Extensión	72°C	50"
Extensión Final	72°C	10'
Mantenimiento final	4°C	

8. PROGRAMA GAP5-9

Primer Sentido:		Tamaño Amplicón
Primer Antisentido:		aprox
Desnaturalización Inicial	95°C	2'30"
Desnaturalización	95°C	30"
Hibridación	51°C	45"
Extensión	72°C	50"
Extensión Final	72°C	10'
Mantenimiento final	4°C	

9. PROGRAMA COLONY PCR

Primer Sentido: M13 F	TGTAACGACGGCCAG	Tamaño Amplicón
Primer Antisentido: M13 R	GTTTTCCAGTCACGAC	Variable
Desnaturalización Inicial	94°C	5'
Desnaturalización	94°C	30"
Hibridación	53°C	20"
Extensión	72°C	1'30"
Extensión Final	72°C	15'
Mantenimiento final	4°C	

Anexo II. ESCALA DE SEVERIDAD DE SÍNTOMAS UTILIZADA

GRADO 1

Hojas con muy leve enrollamiento. La coloración violácea se presenta en forma de pequeñas manchas, en las hojas basales



GRADO 2

Hojas con enrollamiento y coloración rojo violáceo, manteniendo las nervaduras verdes. Estos síntomas se observan en las hojas basales, manteniéndose una parte de la planta con el follaje verde.



GRADO 3

Hojas con enrollamiento y coloración rojo violáceo, manteniendo las nervaduras verdes. Solo una pequeña porción de la planta mantiene el follaje verde, generalmente, los brotes jóvenes.



GRADO 4

Hojas con marcado enrollamiento y coloración rojo violáceo, manteniendo las nervaduras verdes. No se observan hojas verdes.



GRADO 5

Hojas con muy severo enrollamiento y coloración rojo violáceo, incluyendo las nervaduras. Se observa en muchos casos un menor desarrollo de la planta.



Anexo III. MUESTRAS ANALIZADAS POR DAS ELISA

Variedad	Severidad	Color	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-6	GLRaV-7	GLRaV-4-9
Airen	4	Blanca	-	-	-	-	-	-
Aspirant Bouchet	4	Tinta	-	+	-	+	-	-
Aubon	3	Tinta	-	+	-	-	-	-
B.V 5	3	Blanca	+	-	+	-	-	-
B.V.3	2	Blanca	+	-	-	-	-	-
Barbarossa	1	Tinta	-	-	-	-	-	-
Barbarossa	3	Tinta	-	-	-	-	-	-
Barbera d'asti	4	Tinta	-	-	+	-	-	-
Bequignol	2	Tinta	-	-	+	-	-	-
Bequignol	2	Tinta	-	-	-	-	-	-
Bianchetta Trevigiana	1	Blanca	-	-	-	-	-	-
Black Alicante	4	Tinta	-	-	-	-	-	-
Blanca Gordal	2	Blanca	-	+	-	-	-	-
Blanquiña	3	Tinta	-	-	-	-	-	-
Bobal	3	Tinta	-	-	-	-	-	-
Buonamico	2	Tinta	-	-	+	-	-	-
C.G. 2539	3	Tinta	-	-	+	-	-	-
C.G.90450	3	Blanca	-	-	+	-	-	-
Cabernet AB1	3	Tinta	-	+	-	+	-	+
Cabernet AE17	4	Tinta	-	-	-	+	-	+
Cabernet BD4	3	Tinta	-	+	-	+	-	+
Cabernet D33	3	Tinta	-	-	-	+	-	+
Cabernet E6	2	Tinta	-	-	-	+	-	+
Cabernet LR43	5	Tinta	-	-	-	-	-	+
Cabernet LR50	5	Tinta	-	-	-	-	-	+
Cabernet M1	3	Tinta	-	-	-	+	-	+
Caricagiola	3	Tinta	+	-	-	-	-	-
Carmenere	2	Tinta	-	-	-	+	-	+
Catarrato Bianco Lucido	2	Blanca	+	-	-	-	-	-
Chapla de Bessone	3	Blanca	-	-	+	-	-	-
Chardonnay	1	Blanca	-	-	-	-	-	-
Chardonnay	2	Blanca	-	+	-	-	-	-
Chardonnay	3	Blanca	+	-	+	-	-	-
Colgadera	2	Blanca	+	-	-	-	-	+
Colgadera	3	Blanca	-	-	+	-	-	-
Colorino	3	Tinta	-	-	+	-	-	-
Cortese	3	Blanca	-	-	+	-	-	-

Anexos

Variedad	Severidad	Color	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-6	GLRaV-7	GLRaV-4-9
Crouchen	2	Tinta	+	-	-	-	-	-
Crujideiro	3	Blanca	-	-	+	-	-	-
Dattier de Beyrouth	4	Blanca	+	+	-	-	-	-
Dattier de Beyrouth	4	Blanca		-	+	-	-	-
Dolcetto Nero	2	Tinta	-	-	+	-	-	-
Escobera	3	Tinta	-	+	-	-	-	+
Etraire de la Dui	2	Tinta	-	+	-	-	-	-
Fogarina	3	Tinta	+	+	+	-	-	-
Fosters white seedling	2	Blanca	-	-	+	+	-	+
Fosters white seedling	2	Blanca	-	-	-	-	-	-
Fran Noir de la Hate Sone	4	Tinta	-	-	+	-	-	-
Frappato	1	Tinta	-	-	+	-	-	-
Fumosa Moscata	2	Blanca	+	-	-	-	-	-
Gamay de Freaux E16	4	Tinta	-	-	-	+	-	+
Gamay de Freaux	4	Tinta	-	-	-	+	-	-
Garbara Negra	3	Tinta	-	-	-	+	-	-
Garbara Negra	3	Tinta	-	+	+	-	-	-
Garrido Fino	3	Blanca	+	-	+	-	-	-
Giro	2	Tinta	-	-	+	-	-	-
Gobernador Benegas	4	Tinta	-	-	+	-	-	-
Gobernador Benegas	2	Tinta	+	-	-	-	-	-
Grechetto Bianco	2	Blanca	+	-	-	-	-	-
Greco Nero	4	Tinta	+	-	+	-	-	-
Greco Nero	2	Tinta	-	-	+	-	-	-
Joamenco	3	Blanca	-	-	+	-	-	-
Lambrusco di sorbara	3	Tinta	-	-	+	-	-	
Lambrusco Maestri	2	Tinta	+	+	-	-	-	-
Lambrusco Maestri	3	Tinta	+	-	-	-	-	-
Lambrusco Maestri	2	Blanca	-	-	-	-	-	-
Lambrusco Maestri	2	Tinta	-	+	-	-	-	-
Lambrusco Salamino	2	Tinta	+	-	+	-	-	-
Lanjaron Claro	3	Blanca	-	-	-	+	-	+
Maccabeu	2	Blanca	-	-	-	-	-	-
Malbeck selección	2	Tinta	-	-	-	-	-	-
Malvasia	3	Blanca	+	-	+	-	-	-

Anexos

Variedad	Severidad	Color	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-6	GLRaV-7	GLRaV-4-9
Italiana								
Masse Camp	4	Blanca	-	+	+	-	-	+
Merlot	1	Tinta	-	+	-	-	-	-
Molla Bianca	2	Blanca	-	-	+	-	-	-
Mollard	2	Tinta	-	+	+	-	-	-
Mollard	3	Tinta	-	-	+	-	-	-
Mondeuse	2	Tinta		-		-	-	-
Montepulciano	2	Tinta	-	-	-	-	-	-
Montils	3	Blanca	-	-	-	-	-	-
Morenillo	2	Tinta	dudoso	+	+	-	-	-
Murvaion	3	Tinta	-	+	+	-	-	-
Muscat de Saumur	2	Blanca	-	-	-	-	-	-
Muscat de Saumur	2	Blanca	+	-	-	-	-	-
Muscat Fior	4	Tinta	+	-	+	-	-	-
No Identificada (Inv 3)	4	Tinta	-	-	-	+	-	
N.V. 105	2	Tinta		-		-	-	-
N.V. 7	2	Tinta	+	-	+	-	-	
N.V.23	2	Tinta	-	-	+	-	-	-
N.V.47	4	Tinta	-	-	+	-	-	-
Nuragus	3	Blanca	-	-	+	-	-	-
Ortrugo	3	Blanca	-	-	+	-	-	-
Pavana	5	Tinta	-	-	+	-	-	-
Perruno	3	Blanca	-	-	+	-	-	-
Picadillo	3	Blanca	-	+	+	-	-	
Pigato	3	Tinta	-	-	+	-	-	+
Pinot d'aunis	2	Tinta	+	-	-	-	-	-
Pinot Gris	2	Blanca	+	+	-	-	-	-
Pinot Gris	2	Tinta	-	-	-	-	-	-
Pinot Negro	2	Tinta	-	-	-	-	-	-
Pinot Negro	2	Tinta	-	+	-	-	-	-
Pinot Rougin	4	Tinta	+	+	+	-	-	-
Pique Poul	3	Rosada	+	-	-	-	-	-
Plant Droit	2	Tinta	-	-	+	-	-	-
Plavai	2	Blanca	-	+	-	-	-	+
Primiera	4	Blanca	-	+	+	-	-	-
Prosecco Lungo	2	Blanca	-	+	+	-	-	-
Prunesta Nera	2	Tinta	+	-	+	-	-	-
Ribolla Gialla	2	Tinta	-	-	+	-	-	-
Roussane du Var	2	Tinta	+	-	-	-	-	-
Rubí cabernet	2	Tinta	-	+	-	-	-	-
Sabate	2	Tinta	-	-	+	-	-	-
Sacy	2	Blanca	-	-	-	-	-	+

Anexos

Variedad	Severidad	Color	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-6	GLRaV-7	GLRaV-4-9
Sciascinoso	3	Tinta	-	+	+	-	-	-
Shuyler	2	Tinta	-	+	-	-	-	+
Sangiovese Fiano	3	Blanca	-	+	-	-	-	+
Sangiovese Fiano	3	Tinta	-	-	+	-	-	-
Sangiovese Fiano	3	Tinta	+	-	+	-	-	-
Souson	2	Tinta	+	-	-	-	-	-
Souzao/Souzaou	3	Tinta	+	-	-	-	-	-
Souzao/Souzaou	5	Tinta	-	-	+	-	-	-
Syrah 805	2	Tinta	-	+	-	+	-	+
Tachtas	3	Blanca	-	-	+	-	-	-
Taggia Blanca	3	Blanca	+	-	-	-	-	-
Tamares	3	Blanca	-	-	+	-	-	+
Tamares	4	Blanca	-	-	-	-	-	-
Teneron	2	Blanca	-	-	-	+	-	+
Terrano	5	Tinta	-	-	+	-	-	-
Terret N	2	Tinta	-	-	-	-	-	-
Tockai Friulano	2	Blanca	-	+	+	-	-	+
Tockai Friulano	5	Blanca	-	+	+	-	-	-
Tockai Friulano	1	Blanca	-	-	-	-	-	-
Torrontés Riojano	3	Blanca	+	+	-	-	-	+
Torrontés Riojano	3	Blanca	-	-	-	-	-	-
Tripoli (IP352)	4	Rosada	-	-	-	-	-	-
Troussau	3	Tinta	-	-	+	-	-	-
Ugni Blanc	2	Blanca	-	+	-	-	-	-
Uva de Loja	2	Blanca	-	-	-	-	-	-
Verduzco Friulano	3	Blanca	-	+	+	+	-	+
Vespaiola	3	Blanca	-	+	+	-	-	-
Volta	3	Tinta	-	-	+	-	-	-
Wratchansky Misket	3	Blanca	-	+	-	-	-	-
Zariza Malasiata	2	Blanca	-	-	+	-	-	-

Anexo IV. COMANDOS UTILIZADOS Y RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO EN PAUP*

1. COMANDOS PARA EVALUACIÓN DE AJUSTE DE MODELOS (PAUP*)

#NEXUS

[El siguiente comando calculará un árbol de NJ usando el modelo evolutivo JC69]

BEGIN PAUP;

default lscores longfmt=yes;

[Workaround for scorefile problem See PAUP FAQ for explanation. Added by Anders Gorm]

log file= modelfit.log replace;

DSet distance=JC objective=ME base=equal rates=equal pinv=0

subst=all negbrlen=setzero;

NJ showtree=no breakties=random;

End;

[***** Evaluación de 56 Modelos evolutivos *****]

BEGIN PAUP;

Set criterion=like;

[!** Modelo 1 de 56 * Evaluación de JC **]

lscores 1/ nst=1 base=equal rates=equal pinv=0

scorefile=model.scores replace;

[!** Modelo 2 de 56 * Evaluación de JC+I **]

lscores 1/ nst=1 base=equal rates=equal pinv=est

scorefile=model.scores append;

[!** Modelo 3 de 56 * Evaluación de JC+GÊ**]

lscores 1/ nst=1 base=equal rates=gamma shape=est pinv=0

scorefile=model.scores append;

[!** Modelo 4 de 56 * Evaluación de JC+I+G **]

lscores 1/ nst=1 base=equal rates=gamma shape=est pinv=est

scorefile=model.scores append;

[!** Modelo 5 de 56 * Evaluación de F81 **]

lscores 1/ nst=1 base=est rates=equal pinv=0

scorefile=model.scores append;

[!** Modelo 6 de 56 * Evaluación de F81+I **]

lscores 1/ nst=1 base=est rates=equal pinv=est

scorefile=model.scores append;

[!** Modelo 7 de 56 * Evaluación de F81+G **]

lscores 1/ nst=1 base=est rates=gamma shape=est pinv=0

scorefile=model.scores append;

[!** Modelo 8 de 56 * Evaluación de F81+I+G **]

lscores 1/ nst=1 base=est rates=gamma shape=est pinv=est

scorefile=model.scores append;

[!** Modelo 9 de 56 * Evaluación de K80 **]

lscores 1/ nst=2 base=equal tratio=est rates=equal pinv=0

scorefile=model.scores append;

```

[! ** Modelo 10 de 56 * Evaluación de K80+I **]
lscores 1/nst=2 base=equal tratio=est rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 11 de 56 * Evaluación de K80+G **]
lscores 1/nst=2 base=equal tratio=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 12 de 56 * Evaluación de K80+I+G **]
lscores 1/nst=2 base=equal tratio=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 13 de 56 * Evaluación de HKY **]
lscores 1/nst=2 base=est tratio=est rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 14 de 56 * Evaluación de HKY+I **]
lscores 1/nst=2 base=est tratio=est rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 15 de 56 * Evaluación de HKY+G **]
lscores 1/nst=2 base=est tratio=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 16 de 56 * Evaluación de HKY+I+G **]
lscores 1/nst=2 base=est tratio=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 17 de 56 * Evaluación de TrNef **] [a b c d e f]
lscores 1/nst=6 base=equal rmat=est rclass=(a b a e a) rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 18 de 56 * Evaluación de TrNef+I **]
lscores 1/nst=6 base=equal rmat=est rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 19 de 56 * Evaluación de TrNef+G **]
lscores 1/nst=6 base=equal rmat=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 20 de 56 * Evaluación de TrNef+I+G **]
lscores 1/nst=6 base=equal rmat=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 21 de 56 * Evaluación de TrN **]
lscores 1/nst=6 base=est rmat=est rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 22 de 56 * Evaluación de TrN+I **]
lscores 1/nst=6 base=est rmat=est rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 23 de 56 * Evaluación de TrN+G **]
lscores 1/nst=6 base=est rmat=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 24 de 56 * Evaluación de TrN+I+G **]
lscores 1/nst=6 base=est rmat=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 25 de 56 * Evaluación de K3P **] [a b c d e f]
lscores 1/nst=6 base=equal rmat=est rclass=(a b c c b a) rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 26 de 56 * Evaluación de K3P+I **]
lscores 1/nst=6 base=equal rmat=est rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 27 de 56 * Evaluación de K3P+G **]
lscores 1/nst=6 base=equal rmat=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 28 de 56 * Evaluación de K3P+I+G **]

```

```

Iscores 1/ nst=6 base=equal rmat=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 29 de 56 * Evaluación de K3Puf **]
Iscores 1/ nst=6 base=est rmat=est rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 30 de 56 * Evaluación de K3Puf+I **]
Iscores 1/ nst=6 base=est rmat=est rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 31 de 56 * Evaluación de K3Puf+G **]
Iscores 1/ nst=6 base=est rmat=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 32 de 56 * Evaluación de K3Puf+I+G **]
Iscores 1/ nst=6 base=est rmat=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 33 de 56 * Evaluación de TIMef **] [a b c d e f]
Iscores 1/ nst=6 base=equal rmat=est rclass=(a b c c e a) rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 34 de 56 * Evaluación de TIMef+I **]
Iscores 1/ nst=6 base=equal rmat=est rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 35 de 56 * Evaluación de TIMef+G **]
Iscores 1/ nst=6 base=equal rmat=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 36 de 56 * Evaluación de TIMef+I+G **]
Iscores 1/ nst=6 base=equal rmat=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 37 de 56 * Evaluación de TIM **]
Iscores 1/ nst=6 base=est rmat=est rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 38 de 56 * Evaluación de TIM+I **]
Iscores 1/ nst=6 base=est rmat=est rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 39 de 56 * Evaluación de TIM+G **]
Iscores 1/ nst=6 base=est rmat=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 40 de 56 * Evaluación de TIM+I+G **]
Iscores 1/ nst=6 base=est rmat=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 41 de 56 * Evaluación de TVMef **] [a b c d e f]
Iscores 1/ nst=6 base=equal rmat=est rclass=(a b c d b e) rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 42 de 56 * Evaluación de TVMef+I **]
Iscores 1/ nst=6 base=equal rmat=est rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 43 de 56 * Evaluación de TVMef+G **]
Iscores 1/ nst=6 base=equal rmat=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 44 de 56 * Evaluación de TVMef+I+G **]
Iscores 1/ nst=6 base=equal rmat=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 45 de 56 * Evaluación de TVM **]
Iscores 1/ nst=6 base=est rmat=est rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 46 de 56 * Evaluación de TVM+I **]
Iscores 1/ nst=6 base=est rmat=est rates=equal pinv=est

```



```

scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 47 de 56 * Evaluación de TVM+G **]
lscores 1/nst=6 base=est rmat=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 48 de 56 * Evaluación de TVM+I+G **]
lscores 1/nst=6 base=est rmat=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 49 de 56 * Evaluación de SYM **] [a b c d e f]
lscores 1/nst=6 base=equal rmat=est rclass=(a b c d e f) rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 50 de 56 * Evaluación de SYM+I **]
lscores 1/nst=6 base=equal rmat=est rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 51 de 56 * Evaluación de SYM+G **]
lscores 1/nst=6 base=equal rmat=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 52 de 56 * Evaluación de SYM+I+G **]
lscores 1/nst=6 base=equal rmat=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 53 de 56 * Evaluación de GTR **]
lscores 1/nst=6 base=est rmat=est rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 54 de 56 * Evaluación de GTR+IÊ**]
lscores 1/nst=6 base=est rmat=est rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 55 de 56 * Evaluación de GTR+G **]
lscores 1/nst=6 base=est rmat=est rates=gamma shape=est pinv=0
scorefile=model.scores append;
[! ** Modelo 56 de 56 * Evaluación de GTR+I+G **]
lscores 1/nst=6 base=est rmat=est rates=gamma shape=est pinv=est
scorefile=model.scores append;

LOG STOP;

END;

```

2. SALIDA DEL AJUSTE DE MODELOS (MODELTEST)

* MODEL SELECTION UNCERTAINTY : Akaike Weights

Model	lnL	K	AIC	delta	weight	cumweight
TVM+I+G	9002.784	2	9 18023.5	684 0.	0000 0.	3689 0.3689
GTR+I+G	9001.977	5	10 18023.9	551 0.	3867 0.	3041 0.6730
TVM+G	9004.422	9	8 18024.8	457 1.	2773 0.	1948 0.8678
GTR+G	9003.835	9	9 18025.6	719 2.	1035 0.	1289 0.9966
TVMef+I+G	9011.328	1	6 18034.6	562 11.	0879 0.	0014 0.9981
TVMef+G	9012.892	6	5 18035.7	852 12.	2168 0.	0008 0.9989
SYM+I+G	9011.086	9	7 18036.1	738 12.	6055 0.	0007 0.9996
SYM+G	9012.577	1	6 18037.1	543 13.	5859 0.	0004 1.0000
K81uf+I+G	9015.507	8	7 18045.0	156 21.	4473 8.12	e-06 1.0000
TIM+I+G	9014.617	2	8 18045.2	344 21.	6660 7.28	e-06 1.0000
K81uf+G	9018.400	4	6 18048.8	008 25.	2324 1.22	e-06 1.0000
TIM+G	9017.946	3	7 18049.8	926 26.	3242 7.09	e-07 1.0000
HKY+I+G	9019.681	6	6 18051.3	633 27.	7949 3.40	e-07 1.0000
TrN+I+G	9018.744	1	7 18051.4	883 27.	9199 3.19	e-07 1.0000
HKY+G	9022.695	3	5 18055.3	906 31.	8223 4.54	e-08 1.0000

Anexos

TrN+G	9022.210	9	6	18056.4	219	32.	8535	2.71	e-08	1.0000
K81+I+G	9027.989	3	4	18063.9	785	40.	4102	6.19	e-10	1.0000
TIMef+I+G	9027.714	8	5	18065.4	297	41.	8613	3.00	e-10	1.0000
K81+G	9030.620	1	3	18067.2	402	43.	6719	1.21	e-10	1.0000
TIMef+G	9030.130	9	4	18068.2	617	44.	6934	7.28	e-11	1.0000
K80+I+G	9032.361	3	3	18070.7	227	47.	1543	2.13	e-11	1.0000
TrNef+I+G	9032.105	5	4	18072.2	109	48.	6426	1.01	e-11	1.0000
K80+G	9035.092	8	2	18074.1	855	50.	6172	3.76	e-12	1.0000
TrNef+G	9034.620	1	3	18075.2	402	51.	6719	2.22	e-12	1.0000
GTR+I	9209.610	4	9	18437.2	207	413.	6523	0.00	e+00	1.0000
TIM+I	9213.329	1	7	18440.6	582	417.	0898	0.00	e+00	1.0000
TrN+I	9217.304	7	6	18446.6	094	423.	0410	0.00	e+00	1.0000
TVM+I	9218.842	8	8	18453.6	855	430.	1172	0.00	e+00	1.0000
K81uf+I	9223.092	8	6	18458.1	855	434.	6172	0.00	e+00	1.0000
HKY+I	9227.099	6	5	18464.1	992	440.	6309	0.00	e+00	1.0000
SYM+I	9226.688	5	6	18465.3	770	441.	8086	0.00	e+00	1.0000
TVMef+I	9229.152	3	5	18468.3	047	444.	7363	0.00	e+00	1.0000
TIMef+I	9233.459	0	4	18474.9	180	451.	3496	0.00	e+00	1.0000
K81+I	9235.861	3	3	18477.7	227	454.	1543	0.00	e+00	1.0000
TrNef+I	9237.460	9	3	18480.9	219	457.	3535	0.00	e+00	1.0000
K80+I	9239.877	0	2	18483.7	539	460.	1855	0.00	e+00	1.0000
F81+G	9469.935	5	4	18947.8	711	924.	3027	0.00	e+00	1.0000
F81+I+G	9469.485	4	5	18948.9	707	925.	4023	0.00	e+00	1.0000
JC+G	9491.395	5	1	18984.7	910	961.	2227	0.00	e+00	1.0000
JC+I+G	9491.318	4	2	18986.6	367	963.	0684	0.00	e+00	1.0000
F81+I	9626.540	0	4	19261.0	801	1237.	5117	0.00	e+00	1.0000
JC+I	9653.337	9	1	19308.6	758	1285.	1074	0.00	e+00	1.0000
GTR	9729.009	8	8	19474.0	195	1450.	4512	0.00	e+00	1.0000
TVM	9732.578	1	7	19479.1	562	1455.	5879	0.00	e+00	1.0000
TIM	9734.434	6	6	19480.8	691	1457.	3008	0.00	e+00	1.0000
TrN	9738.023	4	5	19486.0	469	1462.	4785	0.00	e+00	1.0000
K81uf	9738.082	0	5	19486.1	641	1462.	5957	0.00	e+00	1.0000
HKY	9741.652	3	4	19491.3	047	1467.	7363	0.00	e+00	1.0000
TVMef	9749.746	1	4	19507.4	922	1483.	9238	0.00	e+00	1.0000
SYM	9749.668	0	5	19509.3	359	1485.	7676	0.00	e+00	1.0000
K81	9756.955	1	2	19517.9	102	1494.	3418	0.00	e+00	1.0000
TIMef	9756.886	7	3	19519.7	734	1496.	2051	0.00	e+00	1.0000
K80	9759.973	6	1	19521.9	473	1498.	3789	0.00	e+00	1.0000
TrNef	9759.905	3	2	19523.8	105	1500.	2422	0.00	e+00	1.0000
F81	10097.480	5	3	20200.9	609	2177.	3926	0.00	e+00	1.0000
JC	10123.377	0	0	20246.7	539	2223.	1855	0.00	e+00	1.0000

-lnL: Negative log likelihood
K: Number of estimated parameters
IC: Information Criterion
delta: Information difference
weight: Information weight
cumWeight: Cumulative information weight

3. COMANDOS PARA ANÁLISIS DE ML (PAUP*)

default lscores longfmt=yes;

Begin paup;

Set criterion=likelihood;

Lset Base=(0.2770 0.2225 0.2480) Nst=6 Rmat=(2.8792 9.5848 1.1971 1.2144 9.5848)

Rates=gamma Shape=0.5164 Pinvar=0.1588;

Hsearch start=nj nchuck=2 chuckscore=5 dstatus=none;

set root=outgroup outroot=monophyl;

```

outgroup FJ209048 AF414119;
savetrees format=nexus brlens=yes append=yes file=treeml.tree;
lscores 1/scorefile=treeml2.sf append=yes;
showtrees all;
End;

```

4. COMANDOS PARA BOOTSTRAPPING DEL ÁRBOL DE ML (PAUP*)

```

BEGIN PAUP;
set autoclose=yes criterion=likelihood notifybeep=yes;
log start file=ampelos36_log3.txt;

set criterion=like autoclose=yes storebrlens=yes increase=auto root=outgroup outroot=monophyl;
outgroup FJ209048 AF414119;
Lset Base=(0.2770 0.2225 0.2480) Nst=6 Rmat=(2.8792 9.5848 1.1971 1.2144 9.5848)
Rates=gamma Shape=0.5164 Pinvar=0.1588;
Hsearch addseq=random nreps=100 start=stepwise savereps=yes swap=tbr multrees=yes;
savetrees format=nexus brlens=yes append=yes file=ml19-04b.all.nex;
lscores 1/scorefile=ml19-04b.sf append=yes;
bootstrap search=Heuristic nreps=100;
log stop;
END;

```

5. COMANDOS PARA ANÁLISIS DE MP (PAUP*)

```

begin paup;
set criterion=parsimony maxtrees=100 increase=auto;
set root=outgroup outroot=monophyl;
outgroup FJ209048 AF414119/only;
Hsearch start=stepwise addseq=random nreps=1000 savereps=yes nchuck=2 chuckscore=5
dstatus=none;
savetrees file=pars.tree brlens=yes;
gettrees file=pars.tree;
contree all/majrule=yes treefile=pars2.tree;
End;

```

6. COMANDOS PARA REALIZAR BOOTSTRAP DE LOS ÁRBOLES DE MP (PAUP*)

```

begin paup;
set maxtrees=100 increase=auto;
set root=outgroup outroot=monophyl;
outgroup FJ209048 AF414119/only;
bootstrap nreps=500 conlevel=70 treefile=bootpars.tree keepall=yes cutoffpct=70 /start=stepwise
addseq=random nreps=1000 savereps=yes nchuck=2 chuckscore=5 dstatus=none;
savetrees file=bootparsb.tree;

End;

```

Anexo V. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS EFECTUADOS EN EL SERVIDOR DATAMONKEY SITIO POR SITIO

En las tablas se indican los valores de dN/dS obtenidos por cada uno de los tres métodos, el valor de significancia de ese valor para la determinación por SLAC y FEL, y el factor de Bayes correspondiente a la determinación por REL. LA significancia se marca en violeta cuando esta por debajo del valor de p-value fijado (0.1) o por encima del factor de Bayes fijado (50). En las tres columnas "Consensus", se representa en color rojo o azul si el sitio esta bajo presión positiva o negativa respectivamente, y en caso de ser un dato significativo, se indica con "+· o "-"

1. VALORES D_N/D_S SITIO POR SITIO EN LAS POSICIONES 1-228

Codon	SLAC dN-dS	SLAC p-value	FEL dN-dS	FEL p-value	REL dN-dS	REL Bayes Factor	Consensus		
							SLAC	FEL	REL
6	1.730	0.376	0.167	0.313	0.042	8,69E+04			+
7	0.690	0.487	0.112	0.558	0.071	1,44E+06			+
8	-1.373	0.810	-0.101	0.664	0.070	8,91E+05			+
9	1.692	0.272	0.293	0.145	0.073	4,08E+07			+
10	-0.128	0.633	0.042	0.887	0.072	2,70E+06			+
11	-2.150	0.877	-0.487	0.166	0.072	2,13E+07			+
13	2.072	0.206	0.583	0.071	0.073	3,24E+08		+	+
14	0.650	0.477	0.077	0.601	0.063	2,97E+05			+
15	2.068	0.240	0.351	0.168	0.073	2,17E+09			+
16	-1.851	0.893	-0.134	0.498	0.041	8,36E+04			+
19	0.383	0.529	0.038	0.801	0.057	1,71E+05			+
22	1.338	0.347	0.131	0.655	0.073	2,11E+08			+
23	0.114	0.593	-0.012	0.947	0.064	3,06E+05			+

Found **51** negatively selected sites (at least one method)

Codon	SLAC dN-dS	SLAC p-value	FEL dN-dS	FEL p-value	REL dN-dS	REL Bayes Factor	Consensus		
							SLAC	FEL	REL
1	0.000	0.000	-0.226	1.000	-0.920	9,93E+04			-
5	-2.265	0.340	-0.198	0.254	-0.839	1,95E+06			-
12	-3.031	0.095	-0.492	0.052	-0.026	0.041	-	-	-
24	-3.981	0.005	-0.295	0.003	-0.938	1,30E+08	-	-	-
25	-1.520	0.157	-0.175	0.035	-0.901	5,22E+07	-	-	-
26	-4.124	0.018	-0.280	0.034	-0.735	1,36E+05	-	-	-
27	-2.900	0.044	-0.322	0.017	-0.847	1,24E+06	-	-	-
29	-2.485	0.047	-0.189	0.018	-0.887	2,73E+07	-	-	-
30	0.448	0.756	-0.002	0.990	-0.729	1,10E+05			-
31	-2.170	0.093	-0.252	0.024	-0.763	3,58E+05	-	-	-
32	-1.999	0.033	-0.119	0.005	-0.956	4,14E+10	-	-	-
33	-3.858	0.003	-0.284	0.000	-0.955	5,90E+09	-	-	-

Codon	SLAC dN-dS	SLAC p-value	FEL dN-dS	FEL p-value	REL dN-dS	REL Bayes Factor	Consensus		
							SLAC	FEL	REL
34	-2.408	0.124	-0.200	0.136	-0.727	6,28E+04			-
36	-1.355	0.170	-0.106	0.104	-0.937	1,22E+08			-
37	-3.180	0.041	-0.538	0.003	-0.738	3,59E+05	-	-	-
38	-3.716	0.059	-0.752	0.007	-0.465	0.588	-	-	-
39	-1.163	0.322	-0.129	0.264	-0.758	1,18E+06			-
40	-2.717	0.060	-0.563	0.000	-0.906	2,28E+06	-	-	-
41	-2.244	0.054	-0.251	0.015	-0.938	1,37E+08	-	-	-
42	-1.647	0.069	-0.131	0.013	-0.955	2,90E+09	-	-	-
43	-1.340	0.155	-0.091	0.037	-0.957	9,45E+11	-	-	-
45	-1.096	0.278	-0.096	0.271	-0.755	3,85E+05			-
46	-0.876	0.281	-0.151	0.011	-0.953	1,00E+09		-	-
47	-3.732	0.001	-0.289	0.000	-0.955	5,23E+09	-	-	-
48	-1.254	0.208	-0.119	0.138	-0.843	2,00E+06			-
49	-2.813	0.031	-0.305	0.007	-0.870	6,09E+06	-	-	-
51	-2.488	0.013	-0.239	0.001	-0.955	4,24E+09	-	-	-
52	-4.266	0.005	-0.492	0.000	-0.860	2,87E+06	-	-	-
53	-5.205	0.007	-0.666	0.002	-0.715	1,49E+04	-	-	-
54	-3.110	0.004	-0.235	0.000	-0.956	2,28E+10	-	-	-
55	-3.110	0.004	-0.288	0.000	-0.954	1,34E+09	-	-	-
56	-4.474	0.009	-0.303	0.011	-0.891	4,11E+07	-	-	-
57	-3.110	0.004	-0.283	0.000	-0.956	2,27E+10	-	-	-
58	-5.061	0.001	-0.311	0.000	-0.956	1,57E+11	-	-	-
59	-3.541	0.011	-0.264	0.005	-0.940	2,24E+08	-	-	-
60	-2.799	0.018	-0.233	0.005	-0.935	6,76E+07	-	-	-
61	-2.167	0.027	-0.168	0.002	-0.951	2,96E+08	-	-	-
62	-5.029	0.001	-0.439	0.000	-0.957	4,87E+11	-	-	-
63	-6.158	0.001	-0.553	0.000	-0.951	8,77E+09	-	-	-
64	-4.533	0.005	-0.431	0.001	-0.924	2,31E+09	-	-	-
66	-6.684	0.000	-1.557	0.000	-0.957	1,30E+11	-	-	-
67	-2.795	0.043	-0.290	0.013	-0.760	4,26E+05	-	-	-
68	-3.110	0.004	-0.271	0.000	-0.954	1,34E+09	-	-	-
69	-4.150	0.001	-0.462	0.000	-0.949	9,94E+07	-	-	-
70	-0.832	0.400	-0.038	0.520	-0.905	1,81E+08			-
71	-3.765	0.005	-0.392	0.000	-0.934	6,99E+07	-	-	-
72	-3.020	0.049	-0.375	0.010	-0.731	5,23E+04	-	-	-
73	-1.218	0.273	-0.150	0.097	-0.885	2,18E+07			-
74	-1.506	0.125	-0.131	0.050	-0.921	1,62E+07			-
75	-3.315	0.055	-0.515	0.007	-0.727	6,41E+04	-	-	-
76	-3.486	0.034	-0.386	0.006	-0.730	1,63E+05	-	-	-

2. VALORES D_N/D_S SITIO POR SITIO EN LAS POSICIONES 229-FINAL

Codon	SLAC dN-dS	SLAC p-value	FEL dN-dS	FEL p-value	REL dN-dS	REL Bayes Factor	Consensus		
							SLAC	SLAC	SLAC
77	-7.605	0.001	-1.215	0.000	-1.064	0.000	-	-	-
78	-6.400	0.012	-1.495	0.000	-1.105	0.000	-	-	-
79	-5.247	0.014	-0.755	0.001	-0.984	0.000	-	-	-
80	-6.716	0.004	-0.800	0.000	-0.989	0.000	-	-	-
81	-5.037	0.016	-0.649	0.004	-0.947	0.000	-	-	-
82	-7.669	0.001	-1.255	0.000	-1.069	0.000	-	-	-
83	-4.474	0.045	-0.649	0.019	-0.919	0.000	-	-	-
85	-5.113	0.012	-0.610	0.001	-0.926	0.000	-	-	-
86	-3.834	0.037	-0.412	0.008	-0.839	0.000	-	-	-

Anexos

Codon	SLAC dN-dS	SLAC p-value	FEL dN-dS	FEL p-value	REL dN-dS	REL Bayes Factor	Consensus		
							SLAC	SLAC	SLAC
88	-7.669	0.001	-1.588	0.000	-1.114	0.000	-	-	-
89	-4.435	0.052	-0.737	0.013	-0.942	0.000	-	-	-
90	-3.834	0.037	-0.473	0.006	-0.869	0.000	-	-	-
91	-6.382	0.039	-1.695	0.007	-0.991	0.000	-	-	-
92	-5.037	0.016	-0.564	0.004	-0.913	0.000	-	-	-
93	-3.453	0.067	-0.403	0.019	-0.858	0.000	-	-	-
94	-4.504	0.044	-0.991	0.004	-0.985	0.000	-	-	-
95	-3.973	0.170	-1.858	0.026	-1.036	0.000	-	-	-
96	-5.113	0.013	-0.909	0.000	-1.011	0.000	-	-	-
97	-5.113	0.012	-0.788	0.001	-0.985	0.000	-	-	-
99	-6.391	0.004	-0.875	0.000	-1.006	0.000	-	-	-
100	-4.634	0.066	-0.636	0.038	-0.901	0.000	-	-	-
103	-4.061	0.048	-0.614	0.002	-0.921	0.000	-	-	-
104	-7.669	0.001	-1.396	0.000	-1.087	0.000	-	-	-
105	-7.946	0.006	-1.320	0.001	-1.036	0.000	-	-	-
106	-3.176	0.117	-0.454	0.044	-0.837	0.000	-	-	-
107	-5.155	0.018	-0.809	0.003	-0.981	0.000	-	-	-
108	-3.834	0.039	-0.502	0.005	-0.871	0.000	-	-	-
109	-6.437	0.018	-0.997	0.001	-1.006	0.000	-	-	-
111	-3.410	0.068	-0.575	0.011	-0.930	0.000	-	-	-
112	-7.458	0.020	-2.381	0.000	-1.179	0.000	-	-	-
113	-6.716	0.004	-0.976	0.001	-1.011	0.000	-	-	-
114	-5.467	0.047	-1.228	0.010	-0.978	0.000	-	-	-
115	-3.358	0.064	-0.392	0.019	-0.864	0.000	-	-	-
116	-10.217	0.001	-2.844	0.000	-1.356	0.000	-	-	-
117	-8.852	0.002	-1.985	0.000	-1.174	0.000	-	-	-
118	-12.020	0.000	-5.248	0.000	-1.842	0.000	-	-	-
119	-5.037	0.016	-0.402	0.011	-0.837	0.000	-	-	-
122	-6.895	0.012	-1.065	0.002	-1.026	0.000	-	-	-
123	-5.111	0.077	-0.846	0.065	-0.818	0.000	-	-	-
124	-3.358	0.064	-0.353	0.016	-0.837	0.000	-	-	-
125	-6.846	0.012	-1.407	0.001	-1.072	0.000	-	-	-
126	-8.395	0.001	-1.229	0.000	-1.063	0.000	-	-	-
128	-10.245	0.002	-1.656	0.000	-1.094	0.000	-	-	-
129	-6.391	0.004	-0.986	0.000	-1.028	0.000	-	-	-
130	-3.358	0.064	-0.272	0.032	-0.757	0.000	-	-	-
131	-6.391	0.005	-1.001	0.000	-1.027	0.000	-	-	-
132	-8.947	0.000	-1.562	0.000	-1.124	0.000	-	-	-
133	-5.113	0.014	-0.725	0.001	-0.967	0.000	-	-	-
134	-3.834	0.037	-0.621	0.002	-0.936	0.000	-	-	-
135	-3.405	0.069	-0.577	0.011	-0.932	0.000	-	-	-
136	-3.834	0.037	-0.566	0.003	-0.919	0.000	-	-	-
137	-8.947	0.001	-1.423	0.000	-1.095	0.000	-	-	-
138	-12.387	0.000	-3.179	0.000	-1.827	0.000	-	-	-
140	-6.391	0.005	-0.796	0.000	-0.992	0.000	-	-	-
142	-4.111	0.033	-0.521	0.005	-0.893	0.000	-	-	-
143	-4.474	0.045	-0.758	0.010	-0.944	0.000	-	-	-
145	-5.113	0.012	-0.546	0.002	-0.900	0.000	-	-	-
146	-5.732	0.020	-0.930	0.003	-0.984	0.000	-	-	-
148	-10.074	0.000	-2.317	0.000	-1.276	0.000	-	-	-
149	-10.074	0.000	-1.397	0.000	-1.090	0.000	-	-	-
150	-3.834	0.037	-0.515	0.005	-0.899	0.000	-	-	-
151	-5.103	0.018	-0.796	0.002	-0.980	0.000	-	-	-
152	-9.098	0.005	-2.634	0.000	-1.197	0.000	-	-	-
153	-7.669	0.001	-1.101	0.000	-1.049	0.000	-	-	-

Codon	SLAC dN-dS	SLAC p-value	FEL dN-dS	FEL p-value	REL dN-dS	REL Bayes Factor	Consensus		
							SLAC	SLAC	SLAC
154	-4.794	0.067	-0.776	0.015	-0.934	0.000	-	-	-
155	-3.834	0.037	-0.479	0.005	-0.867	0.000	-	-	-
156	-5.752	0.018	-0.816	0.004	-0.969	0.000	-	-	-
157	-13.432	0.000	-6.209	0.000	-1.376	0.000	-	-	-
158	-6.716	0.004	-1.291	0.000	-1.046	0.000	-	-	-
159	-3.389	0.069	-0.488	0.015	-0.907	0.000	-	-	-
160	-3.828	0.111	-0.437	0.028	-0.910	0.000	-	-	-
161	-1.696	0.263	-0.215	0.090	-0.786	0.000	-	-	-
162	-7.669	0.001	-1.226	0.000	-1.064	0.000	-	-	-
163	-7.030	0.007	-1.093	0.001	-1.017	0.000	-	-	-
164	-7.802	0.002	-1.272	0.000	-1.080	0.000	-	-	-
166	-6.716	0.004	-0.845	0.001	-0.993	0.000	-	-	-
167	-3.834	0.038	-0.461	0.006	-0.850	0.000	-	-	-
168	-6.939	0.006	-1.102	0.000	-1.027	0.000	-	-	-
170	-3.190	0.113	-0.407	0.060	-0.819	0.000	-	-	-
173	-6.716	0.006	-0.846	0.002	-0.995	0.000	-	-	-
174	-5.118	0.018	-0.794	0.002	-0.979	0.000	-	-	-
175	-4.466	0.053	-0.462	0.049	-0.852	0.000	-	-	-
176	-7.669	0.001	-1.236	0.000	-1.066	0.000	-	-	-
177	-2.590	0.209	-0.483	0.086	-0.843	0.000	-	-	-
178	-8.210	0.001	-1.306	0.000	-1.077	0.000	-	-	-
179	-3.420	0.111	-0.508	0.025	-0.900	0.000	-	-	-
180	-3.358	0.064	-0.368	0.015	-0.849	0.000	-	-	-
181	-6.391	0.004	-1.284	0.000	-1.066	0.000	-	-	-
182	-8.211	0.001	-1.380	0.000	-1.087	0.000	-	-	-
183	-8.308	0.003	-1.683	0.000	-1.109	0.000	-	-	-
184	-5.037	0.016	-0.484	0.004	-0.882	0.000	-	-	-
185	-7.030	0.007	-1.127	0.001	-1.018	0.000	-	-	-
186	-5.113	0.012	-0.783	0.001	-0.983	0.000	-	-	-
187	-7.669	0.001	-1.311	0.000	-1.077	0.000	-	-	-
188	-16.477	0.000	-3.246	0.000	-1.484	0.000	-	-	-
189	-5.113	0.012	-0.876	0.000	-1.005	0.000	-	-	-
190	-3.445	0.110	-0.508	0.023	-0.893	0.000	-	-	-
191	-5.113	0.012	-0.830	0.001	-0.993	0.000	-	-	-
192	-3.735	0.114	-0.504	0.023	-0.926	0.000	-	-	-
193	-5.113	0.013	-0.715	0.001	-0.968	0.000	-	-	-
194	-3.834	0.041	-0.527	0.006	-0.902	0.000	-	-	-
195	-10.225	0.000	-1.663	0.000	-1.149	0.000	-	-	-
196	-5.162	0.017	-0.637	0.004	-0.939	0.000	-	-	-
197	-3.179	0.086	-0.385	0.011	-0.721	0.000	-	-	-
198	-6.825	0.005	-1.200	0.000	-1.049	0.000	-	-	-
199	-6.391	0.004	-0.910	0.000	-1.017	0.000	-	-	-
200	-6.716	0.004	-1.157	0.000	-1.036	0.000	-	-	-
201	-3.834	0.037	-0.518	0.004	-0.890	0.000	-	-	-
202	-6.810	0.005	-1.341	0.000	-1.070	0.000	-	-	-
203	-6.436	0.018	-0.919	0.003	-0.991	0.000	-	-	-
204	-8.395	0.001	-1.308	0.000	-1.072	0.000	-	-	-
207	-1.679	0.254	-0.188	0.090	-0.713	0.000	-	-	-
208	-2.556	0.112	-0.263	0.030	-0.724	0.000	-	-	-
209	-7.109	0.006	-1.447	0.000	-1.064	0.000	-	-	-
210	-6.391	0.004	-1.000	0.000	-1.032	0.000	-	-	-
211	-3.834	0.037	-0.566	0.004	-0.919	0.000	-	-	-
212	-8.395	0.001	-1.158	0.000	-1.050	0.000	-	-	-
213	-6.716	0.006	-1.051	0.001	-1.031	0.000	-	-	-
214	-3.358	0.076	-0.353	0.030	-0.813	0.000	-	-	-

Codon	SLAC dN-dS	SLAC p-value	FEL dN-dS	FEL p-value	REL dN-dS	REL Bayes Factor	Consensus		
							SLAC	SLAC	SLAC
215	-5.113	0.012	-0.931	0.000	-1.011	0.000	-	-	
217	-5.113	0.013	-0.649	0.002	-0.944	0.000	-	-	
218	-7.669	0.001	-1.444	0.000	-1.092	0.000	-	-	
219	-11.182	0.000	-2.305	0.000	-1.258	0.000	-	-	
220	-5.037	0.019	-0.672	0.002	-0.953	0.000	-	-	
221	-4.782	0.028	-0.690	0.001	-0.961	0.000	-	-	
222	-8.395	0.001	-1.125	0.000	-1.048	0.000	-	-	
225	-5.113	0.012	-0.639	0.001	-0.940	0.000	-	-	
226	-5.720	0.009	-0.831	0.001	-0.993	0.000	-	-	
227	-5.293	0.020	-1.010	0.000	-1.042	0.000	-	-	
228	-5.037	0.016	-0.595	0.003	-0.934	0.000	-	-	
229	-2.556	0.111	-0.252	0.033	-0.726	0.000	-	-	
230	-10.074	0.000	-1.720	0.000	-1.127	0.000	-	-	
231	-13.432	0.000	-4.561	0.000	-1.854	0.000	-	-	
232	-5.113	0.012	-0.832	0.001	-0.989	0.000	-	-	
233	-8.947	0.001	-1.479	0.000	-1.105	0.000	-	-	
234	-6.875	0.004	-1.151	0.000	-1.061	0.000	-	-	
235	-7.669	0.001	-1.149	0.000	-1.056	0.000	-	-	
237	-3.412	0.068	-0.545	0.010	-0.911	0.000	-	-	
238	-4.806	0.059	-0.871	0.005	-0.984	0.000	-	-	
239	-3.828	0.101	-0.529	0.070	-0.859	0.000	-	-	
240	-5.083	0.018	-0.959	0.002	-1.011	0.000	-	-	
242	-5.113	0.012	-0.822	0.001	-0.991	0.000	-	-	
243	-7.669	0.001	-1.101	0.000	-1.050	0.000	-	-	
244	-3.882	0.108	-0.635	0.046	-0.897	0.000	-	-	
245	-10.074	0.000	-1.524	0.000	-1.104	0.000	-	-	
246	-3.455	0.067	-0.422	0.018	-0.868	0.000	-	-	
247	-10.225	0.000	-2.467	0.000	-1.541	0.000	-	-	
248	-5.113	0.013	-0.608	0.002	-0.930	0.000	-	-	
249	-4.466	0.053	-0.561	0.039	-0.900	0.000	-	-	
254	-8.947	0.000	-1.401	0.000	-1.096	0.000	-	-	
255	-10.074	0.000	-1.630	0.000	-1.119	0.000	-	-	
257	-2.291	0.174	-0.273	0.030	-0.627	0.000	-	-	
258	-4.408	0.065	-0.468	0.079	-0.864	0.000	-	-	
259	-5.112	0.018	-0.875	0.002	-0.994	0.000	-	-	
260	-7.829	0.005	-1.090	0.002	-1.008	0.000	-	-	
261	-7.669	0.001	-1.090	0.000	-1.050	0.000	-	-	
262	-12.072	0.000	-3.483	0.000	-1.911	0.000	-	-	
264	-6.391	0.004	-0.820	0.000	-0.999	0.000	-	-	
265	-6.391	0.004	-0.881	0.000	-1.012	0.000	-	-	
267	-2.877	0.088	-0.294	0.021	-0.768	0.000	-	-	
269	-2.430	0.160	-0.322	0.022	-0.705	0.000	-	-	
270	-2.556	0.112	-0.273	0.028	-0.714	0.000	-	-	
272	-3.088	0.167	-0.516	0.096	-0.861	0.000	-	-	
273	-3.640	0.173	-0.901	0.042	-0.837	0.000	-	-	

Anexo VI. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PREDICCIÓN DE EPÍTOPES**LINEALES POR BEPIPRED**

Aminoácido	AM162279	AM176759	FJ467503	AF233934	HQ828120	HQ828121	HQ828110	HQ828118	HQ828123	HQ828124
1	0,03	0,03	-0,36	0,91	0,72	0,51	-0,31	0,48	0,72	0,48
2	0,29	0,29	-0,11	0,95	0,73	0,58	-0,22	0,52	0,73	0,52
3	0,55	0,55	0,21	1,01	0,87	0,56	-0,15	0,57	0,87	0,57
4	0,50	0,57	0,22	0,90	0,88	0,48	-0,29	0,52	0,88	0,52
5	0,66	0,77	0,38	0,91	0,89	0,43	-0,52	0,57	0,89	0,57
6	0,82	1,17	0,38	1,07	1,08	0,54	-0,29	0,74	1,08	0,74
7	0,99	1,39	0,58	1,11	1,14	0,62	-0,10	0,86	1,14	0,86
8	1,09	1,54	0,74	0,93	1,03	0,50	0,15	0,74	1,03	0,74
9	1,28	1,73	1,19	0,94	0,88	0,44	0,53	0,68	0,88	0,68
10	1,47	1,92	1,42	0,90	0,80	0,63	0,98	0,89	0,80	0,89
11	1,45	1,91	1,50	1,13	1,00	0,99	1,26	1,27	1,00	1,27
12	1,39	1,84	1,50	1,26	1,04	1,16	1,48	1,38	1,04	1,38
13	1,41	1,81	1,67	1,41	1,22	1,40	1,80	1,58	1,22	1,58
14	1,33	1,67	1,86	1,55	1,47	1,54	2,31	1,50	1,47	1,50
15	1,43	1,53	2,22	1,67	1,67	1,77	2,25	1,68	1,67	1,68
16	1,52	1,57	2,39	1,70	1,70	1,75	2,18	1,57	1,70	1,57
17	1,65	1,65	2,54	1,89	1,89	1,97	2,01	1,78	1,89	1,78
18	1,75	1,75	2,56	2,02	1,90	2,10	1,84	1,76	1,90	1,76
19	1,62	1,62	2,43	1,90	1,99	1,99	1,50	1,64	1,99	1,64
20	1,66	1,66	2,41	1,74	1,89	1,72	1,33	1,36	1,89	1,36
21	1,67	1,74	2,43	1,57	1,77	1,62	1,30	1,27	1,77	1,27
22	1,76	1,91	2,44	1,52	1,60	1,50	1,38	1,16	1,60	1,16
23	1,38	1,92	2,20	1,30	1,26	1,40	1,33	1,16	1,26	1,16
24	1,27	1,89	2,07	1,26	1,11	1,28	1,48	1,06	1,11	1,06
25	1,05	1,75	1,85	1,27	1,09	1,30	1,46	1,11	1,09	1,11
26	0,74	1,45	1,50	1,38	1,13	1,38	1,37	1,21	1,13	1,21
27	0,61	1,31	1,32	1,33	1,22	1,33	1,46	1,30	1,22	1,30
28	0,60	1,30	1,27	1,48	1,38	1,48	1,25	1,47	1,38	1,47
29	0,62	1,32	1,14	1,46	1,38	1,46	1,23	1,46	1,38	1,46
30	0,63	1,28	1,09	1,37	1,28	1,37	1,12	1,37	1,28	1,37
31	0,71	1,29	1,09	1,46	1,37	1,46	0,70	1,46	1,37	1,46
32	1,09	1,33	1,13	1,25	1,17	1,25	0,56	1,25	1,17	1,25
33	1,16	1,34	1,13	1,23	1,15	1,23	0,48	1,23	1,15	1,23
34	1,36	1,47	1,27	1,12	1,05	1,12	0,12	1,12	1,05	1,12
35	1,16	1,28	1,07	0,70	0,68	0,70	0,10	0,70	0,68	0,70
36	1,16	1,28	1,09	0,56	0,55	0,56	-0,23	0,56	0,55	0,56
37	1,05	1,17	0,99	0,48	0,48	0,48	-0,15	0,48	0,48	0,48
38	0,67	0,79	0,76	0,12	0,12	0,12	-0,20	0,12	0,12	0,12
39	0,55	0,65	0,64	0,10	0,10	0,10	-0,18	0,10	0,10	0,10
40	0,37	0,45	0,45	-0,23	-0,23	-0,23	0,12	-0,23	-0,26	-0,23
41	0,04	0,07	0,06	-0,15	-0,15	-0,15	0,19	-0,15	-0,22	-0,15
42	0,00	0,02	-0,01	-0,20	-0,20	-0,20	0,15	-0,20	-0,38	-0,20
43	-0,23	-0,23	-0,29	-0,18	-0,18	-0,18	0,28	-0,18	-0,39	-0,19
44	0,09	0,09	0,02	0,12	0,12	0,12	0,45	0,12	-0,12	0,11
45	0,11	0,11	0,02	0,19	0,19	0,19	0,65	0,19	-0,06	0,09
46	0,15	0,15	0,07	0,15	0,15	0,15	0,59	0,15	-0,09	0,05
47	0,45	0,45	0,37	0,28	0,28	0,28	0,61	0,28	0,04	0,17
48	0,28	0,28	0,20	0,45	0,45	0,45	0,37	0,45	0,21	0,34
49	0,33	0,33	0,25	0,65	0,65	0,65	-0,06	0,65	0,44	0,54
50	0,42	0,42	0,35	0,59	0,59	0,59	-0,42	0,59	0,41	0,48
51	0,54	0,54	0,48	0,61	0,61	0,61	-0,46	0,61	0,54	0,50

Aminoácido	AM162279	AM176759	FJ467503	AF233934	HQ828120	HQ828121	HQ828110	HQ828118	HQ828123	HQ828124
52	0,68	0,68	0,64	0,37	0,37	0,37	-0,28	0,37	0,34	0,27
53	0,38	0,38	0,36	-0,06	-0,06	-0,06	-0,23	-0,06	-0,06	-0,16
54	0,38	0,38	0,38	-0,42	-0,42	-0,42	-0,12	-0,42	-0,42	-0,43
55	0,13	0,13	0,13	-0,46	-0,46	-0,46	0,12	-0,46	-0,46	-0,47
56	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,06	-0,28	-0,28	-0,28
57	-0,42	-0,42	-0,42	-0,23	-0,23	-0,23	-0,22	-0,23	-0,23	-0,23
58	-0,43	-0,43	-0,43	-0,12	-0,12	-0,12	0,14	-0,12	-0,12	-0,12
59	-0,21	-0,21	-0,20	0,12	0,12	0,12	0,09	0,12	0,12	0,12
60	-0,27	-0,27	-0,17	-0,06	-0,06	-0,06	0,05	-0,06	-0,06	-0,06
61	-0,19	-0,19	-0,08	-0,22	-0,22	-0,22	-0,10	-0,22	-0,22	-0,22
62	0,04	0,04	0,16	0,14	0,14	0,22	-0,60	0,14	0,14	0,14
63	-0,19	-0,19	-0,08	0,09	0,09	0,25	-0,62	0,09	0,09	0,09
64	-0,37	-0,37	-0,25	0,05	0,05	0,21	-0,77	0,05	0,05	0,05
65	-0,02	-0,02	0,10	-0,10	-0,10	0,15	-0,63	-0,10	-0,10	-0,10
66	-0,05	-0,05	0,06	-0,62	-0,61	-0,28	-0,32	-0,62	-0,61	-0,62
67	-0,09	-0,09	0,02	-0,66	-0,64	-0,32	-0,62	-0,66	-0,64	-0,66
68	-0,18	-0,18	-0,08	-0,96	-0,92	-0,62	-0,67	-0,96	-0,92	-0,96
69	-0,57	-0,57	-0,56	-0,84	-0,79	-0,50	-0,70	-0,84	-0,79	-0,84
70	-0,58	-0,58	-0,57	-0,55	-0,50	-0,22	-0,88	-0,55	-0,50	-0,55
71	-0,82	-0,82	-0,82	-0,85	-0,79	-0,60	-0,47	-0,85	-0,79	-0,85
72	-0,70	-0,70	-0,70	-0,91	-0,85	-0,73	-0,74	-0,91	-0,85	-0,91
73	-0,40	-0,40	-0,40	-0,93	-0,88	-0,75	-0,57	-0,93	-0,88	-0,93
74	-0,70	-0,70	-0,70	-1,11	-1,06	-1,02	-0,50	-1,11	-1,06	-1,11
75	-0,77	-0,77	-0,77	-0,68	-0,63	-0,68	-0,51	-0,68	-0,63	-0,68
76	-0,79	-0,79	-0,79	-0,93	-0,90	-0,93	-0,37	-0,93	-0,90	-0,93
77	-1,02	-1,02	-1,02	-0,62	-0,60	-0,62	0,09	-0,62	-0,60	-0,62
78	-0,70	-0,70	-0,70	-0,52	-0,51	-0,52	0,20	-0,52	-0,51	-0,52
79	-0,98	-0,98	-0,98	-0,51	-0,51	-0,51	0,56	-0,51	-0,51	-0,51
80	-0,73	-0,73	-0,73	-0,37	-0,37	-0,37	0,45	-0,37	-0,37	-0,37
81	-0,65	-0,65	-0,65	0,09	0,09	0,09	0,57	0,09	0,09	0,09
82	-0,75	-0,75	-0,75	0,20	0,20	0,20	0,31	0,20	0,20	0,20
83	-0,62	-0,62	-0,62	0,56	0,56	0,56	-0,02	0,56	0,56	0,56
84	-0,18	-0,18	-0,18	0,45	0,45	0,45	0,03	0,45	0,45	0,45
85	-0,07	-0,07	-0,07	0,57	0,57	0,57	0,11	0,57	0,57	0,57
86	0,30	0,30	0,30	0,31	0,31	0,31	0,07	0,31	0,31	0,31
87	0,28	0,28	0,28	-0,02	-0,02	-0,02	-0,09	-0,02	-0,02	-0,02
88	0,47	0,47	0,41	0,03	0,03	0,03	-0,51	0,03	0,03	0,03
89	0,30	0,30	0,17	0,11	0,11	0,11	-0,84	0,11	0,11	0,11
90	0,33	0,33	-0,08	0,07	0,07	0,07	-0,78	0,07	0,07	0,07
91	0,55	0,55	0,08	-0,09	-0,09	-0,09	-0,82	-0,09	-0,09	-0,09
92	0,71	0,71	0,17	-0,51	-0,51	-0,51	-0,46	-0,51	-0,51	-0,51
93	0,68	0,68	0,14	-0,84	-0,84	-0,84	-0,34	-0,84	-0,84	-0,84
94	0,52	0,52	-0,02	-0,78	-0,78	-0,78	-0,11	-0,78	-0,78	-0,78
95	0,10	0,10	-0,44	-0,84	-0,84	-0,84	-0,04	-0,84	-0,84	-0,84
96	-0,24	-0,24	-0,78	-0,50	-0,50	-0,50	0,13	-0,50	-0,50	-0,50
97	-0,38	-0,38	-0,85	-0,44	-0,44	-0,44	0,25	-0,44	-0,44	-0,44
98	-0,50	-0,50	-0,90	-0,22	-0,22	-0,22	0,73	-0,22	-0,22	-0,22
99	-0,52	-0,52	-0,66	-0,17	-0,17	-0,17	0,87	-0,17	-0,17	-0,17
100	-0,54	-0,54	-0,60	0,00	0,00	0,00	1,28	0,00	0,00	0,00
101	-0,50	-0,50	-0,50	0,12	0,12	0,12	1,40	0,12	0,12	0,12
102	-0,46	-0,46	-0,46	0,60	0,60	0,60	1,37	0,60	0,60	0,60
103	-0,30	-0,30	-0,30	0,73	0,73	0,73	1,15	0,73	0,73	0,73
104	-0,18	-0,18	-0,18	1,16	1,16	1,16	1,10	1,16	1,16	1,16
105	0,31	0,31	0,31	1,30	1,30	1,30	0,80	1,30	1,30	1,30
106	0,57	0,57	0,57	1,33	1,33	1,33	0,93	1,33	1,33	1,33
107	1,01	1,01	1,01	1,13	1,13	1,13	0,37	1,13	1,13	1,13
108	1,15	1,15	1,15	1,10	1,10	1,10	-0,17	1,10	1,10	1,10

Aminoácido	AM162279	AM176759	FJ467503	AF233934	HQ828120	HQ828121	HQ828110	HQ828118	HQ828123	HQ828124
109	1,20	1,20	1,20	0,80	0,80	0,80	-0,61	0,80	0,80	0,80
110	1,12	1,12	1,12	0,93	0,93	0,93	-0,89	0,93	0,93	0,93
111	1,09	1,09	1,09	0,37	0,37	0,37	-0,98	0,37	0,37	0,37
112	0,80	0,80	0,80	-0,17	-0,17	-0,17	-1,18	-0,17	-0,17	-0,17
113	0,94	0,94	0,94	-0,61	-0,61	-0,61	-1,19	-0,61	-0,61	-0,61
114	0,39	0,39	0,39	-0,89	-0,89	-0,89	-0,93	-0,89	-0,89	-0,89
115	-0,03	-0,03	-0,03	-0,98	-0,98	-0,98	-1,17	-0,98	-0,98	-0,98
116	-0,53	-0,53	-0,53	-1,18	-1,18	-1,18	-1,04	-1,18	-1,18	-1,18
117	-0,86	-0,86	-0,86	-1,19	-1,19	-1,19	-0,68	-1,19	-1,12	-1,19
118	-1,22	-1,22	-1,22	-0,93	-0,93	-0,93	-0,43	-0,93	-0,79	-0,93
119	-1,47	-1,47	-1,47	-1,17	-1,17	-1,17	-0,25	-1,17	-0,64	-1,17
120	-1,53	-1,53	-1,53	-1,04	-1,04	-1,04	-0,08	-1,04	-0,43	-1,04
121	-1,28	-1,28	-1,28	-0,68	-0,68	-0,68	0,37	-0,68	-0,01	-0,68
122	-1,52	-1,52	-1,52	-0,43	-0,43	-0,43	0,43	-0,43	0,24	-0,43
123	-1,39	-1,39	-1,39	-0,25	-0,25	-0,25	0,55	-0,25	0,42	-0,25
124	-1,15	-1,15	-1,15	-0,08	-0,08	-0,08	0,81	-0,08	0,59	-0,08
125	-0,86	-0,86	-0,86	0,37	0,37	0,37	1,21	0,37	1,04	0,37
126	-0,62	-0,62	-0,62	0,43	0,43	0,43	1,35	0,43	1,03	0,43
127	-0,19	-0,19	-0,19	0,55	0,55	0,55	1,55	0,55	1,08	0,55
128	0,31	0,31	0,31	0,81	0,81	0,81	1,56	0,81	0,95	0,81
129	0,43	0,43	0,43	1,21	1,21	1,21	1,52	1,21	1,27	1,21
130	0,55	0,55	0,55	1,35	1,35	1,35	1,29	1,35	1,35	1,35
131	0,81	0,81	0,81	1,55	1,55	1,55	1,24	1,55	1,55	1,55
132	1,20	1,20	1,20	1,56	1,56	1,56	0,85	1,56	1,56	1,56
133	1,34	1,34	1,34	1,52	1,52	1,52	0,95	1,52	1,52	1,52
134	1,41	1,41	1,41	1,29	1,36	1,29	0,91	1,29	1,36	1,29
135	1,42	1,42	1,42	1,24	1,37	1,24	0,93	1,24	1,37	1,24
136	1,37	1,37	1,37	0,85	1,33	0,85	0,77	0,85	1,33	0,85
137	1,14	1,14	1,14	0,95	1,49	0,95	0,84	0,95	1,49	0,95
138	1,09	1,09	1,09	0,91	1,52	0,91	0,84	0,91	1,52	0,91
139	0,70	0,70	0,70	0,93	1,54	0,93	0,95	0,93	1,54	0,93
140	0,80	0,80	0,80	0,77	1,38	0,77	1,07	0,77	1,38	0,77
141	0,76	0,76	0,76	0,84	1,45	0,84	1,12	0,84	1,45	0,84
142	0,79	0,79	0,79	0,84	1,45	0,84	1,07	0,84	1,45	0,84
143	0,75	0,75	0,75	0,95	1,49	0,95	0,82	0,95	1,49	0,95
144	0,83	0,83	0,83	1,07	1,55	1,07	0,66	1,07	1,55	1,07
145	0,84	0,84	0,84	1,12	1,26	1,12	0,66	1,12	1,26	1,12
146	0,95	0,95	0,95	1,07	1,14	1,07	0,59	1,07	1,14	1,07
147	1,07	1,07	1,07	0,82	0,82	0,82	0,54	0,82	0,82	0,82
148	1,12	1,12	1,12	0,66	0,66	0,66	0,22	0,66	0,66	0,66
149	1,08	1,08	1,08	0,66	0,66	0,66	0,13	0,66	0,66	0,66
150	0,83	0,83	0,83	0,59	0,59	0,59	0,26	0,59	0,59	0,59
151	0,76	0,76	0,76	0,54	0,54	0,54	0,21	0,54	0,54	0,54
152	0,76	0,76	0,76	0,22	0,22	0,22	0,17	0,22	0,22	0,22
153	0,70	0,70	0,70	0,13	0,13	0,13	0,36	0,13	0,13	0,13
154	0,65	0,65	0,65	0,26	0,26	0,26	0,40	0,26	0,26	0,26
155	0,33	0,33	0,33	0,21	0,21	0,21	0,37	0,21	0,21	0,21
156	0,24	0,24	0,24	0,17	0,17	0,17	0,10	0,17	0,17	0,17
157	0,38	0,38	0,38	0,36	0,36	0,36	0,33	0,36	0,36	0,36
158	0,32	0,32	0,32	0,40	0,40	0,40	0,34	0,40	0,40	0,40
159	0,27	0,27	0,27	0,37	0,37	0,37	0,15	0,37	0,37	0,37
160	0,37	0,37	0,37	0,10	0,10	0,10	0,25	0,10	0,10	0,10
161	0,40	0,40	0,40	0,33	0,33	0,33	0,41	0,33	0,33	0,33
162	0,37	0,37	0,37	0,34	0,34	0,34	0,43	0,34	0,34	0,34
163	0,10	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15	0,61	0,15	0,15	0,15
164	0,33	0,33	0,33	0,25	0,25	0,25	0,68	0,25	0,25	0,25
165	0,34	0,34	0,34	0,41	0,41	0,41	0,99	0,41	0,41	0,41

Aminoácido	AM162279	AM176759	FJ467503	AF233934	HQ828120	HQ828121	HQ828110	HQ828118	HQ828123	HQ828124
166	0,15	0,15	0,15	0,43	0,43	0,43	1,06	0,43	0,43	0,43
167	0,25	0,25	0,25	0,61	0,61	0,61	1,15	0,61	0,61	0,61
168	0,41	0,41	0,41	0,68	0,68	0,68	1,10	0,68	0,68	0,68
169	0,43	0,43	0,43	0,99	0,99	0,99	1,09	0,99	0,99	0,99
170	0,45	0,45	0,45	1,06	1,06	1,06	1,14	1,06	1,06	1,06
171	0,36	0,36	0,36	1,15	1,15	1,15	0,93	1,15	1,15	1,15
172	0,27	0,27	0,27	1,10	1,10	1,10	0,44	1,10	1,10	1,10
173	0,17	0,17	0,17	1,09	1,09	1,09	0,29	1,09	1,09	1,09
174	0,09	0,09	0,09	1,14	1,14	1,14	0,07	1,14	1,14	1,14
175	0,04	0,04	0,04	0,93	0,93	0,93	-0,12	0,93	0,93	0,93
176	0,03	0,03	0,03	0,44	0,44	0,44	-0,56	0,44	0,44	0,44
177	0,08	0,08	0,08	0,29	0,29	0,29	-0,46	0,29	0,29	0,29
178	-0,13	-0,13	-0,13	0,07	0,07	0,07	-0,54	0,07	0,07	0,07
179	-0,46	-0,46	-0,46	-0,12	-0,12	-0,12	-0,47	-0,12	-0,12	-0,12
180	-0,45	-0,45	-0,45	-0,56	-0,56	-0,56	-0,62	-0,56	-0,56	-0,56
181	-0,26	-0,26	-0,26	-0,46	-0,46	-0,46	-0,20	-0,46	-0,46	-0,46
182	-0,29	-0,29	-0,29	-0,54	-0,54	-0,54	-0,14	-0,54	-0,54	-0,54
183	-0,56	-0,56	-0,56	-0,47	-0,47	-0,47	0,04	-0,47	-0,47	-0,47
184	-0,46	-0,46	-0,46	-0,62	-0,62	-0,62	0,22	-0,62	-0,62	-0,62
185	-0,54	-0,54	-0,54	-0,20	-0,20	-0,20	0,22	-0,20	-0,20	-0,20
186	-0,47	-0,47	-0,47	-0,14	-0,14	-0,14	0,43	-0,14	-0,14	-0,14
187	-0,62	-0,62	-0,62	0,04	0,04	0,04	0,27	0,04	0,04	0,04
188	-0,20	-0,20	-0,20	0,22	0,22	0,22	0,34	0,22	0,22	0,22
189	-0,14	-0,14	-0,14	0,22	0,22	0,22	0,51	0,22	0,22	0,22
190	0,04	0,04	0,04	0,43	0,43	0,43	0,34	0,43	0,43	0,43
191	0,22	0,22	0,22	0,27	0,27	0,27	-0,09	0,27	0,27	0,27
192	0,22	0,22	0,22	0,34	0,34	0,34	-0,29	0,34	0,34	0,34
193	0,43	0,43	0,43	0,51	0,51	0,51	-0,52	0,51	0,51	0,51
194	0,27	0,27	0,27	0,34	0,34	0,34	-0,19	0,34	0,34	0,34
195	0,34	0,34	0,34	-0,09	-0,09	-0,09	-0,24	-0,09	-0,09	-0,14
196	0,51	0,51	0,51	-0,29	-0,29	-0,29	0,10	-0,29	-0,29	-0,39
197	0,34	0,34	0,34	-0,52	-0,52	-0,52	0,04	-0,52	-0,52	-0,77
198	-0,09	-0,09	-0,09	-0,19	-0,19	-0,19	0,25	-0,19	-0,19	-0,49
199	-0,29	-0,29	-0,29	-0,24	-0,24	-0,24	0,44	-0,24	-0,24	-0,58
200	-0,52	-0,52	-0,52	0,10	0,10	0,10	1,04	0,10	0,10	-0,25
201	-0,19	-0,19	-0,19	0,04	0,04	0,04	1,25	0,04	0,04	-0,30
202	-0,25	-0,25	-0,25	0,25	0,25	0,25	1,35	0,25	0,25	-0,09
203	0,07	0,07	0,07	0,44	0,44	0,44	1,35	0,44	0,44	0,10
204	-0,09	-0,09	-0,09	1,04	1,04	1,04	1,44	1,04	1,04	0,75
205	0,11	0,11	0,11	1,25	1,25	1,25	1,60	1,25	1,25	1,01
206	0,28	0,28	0,28	1,35	1,35	1,35	1,59	1,35	1,35	1,26
207	0,88	0,88	0,88	1,35	1,35	1,35	1,55	1,35	1,35	1,30
208	1,09	1,09	1,09	1,44	1,44	1,44	1,35	1,44	1,44	1,44
209	1,20	1,20	1,20	1,60	1,58	1,60	0,66	1,60	1,60	1,60
210	1,19	1,19	1,19	1,59	1,56	1,59	0,40	1,59	1,59	1,59
211	1,30	1,30	1,30	1,55	1,44	1,55	0,24	1,55	1,55	1,55
212	1,47	1,47	1,47	1,35	1,22	1,35	0,32	1,35	1,35	1,35
213	1,56	1,56	1,56	0,66	0,51	0,66	0,12	0,66	0,66	0,66
214	1,54	1,54	1,54	0,40	0,25	0,40	-0,24	0,40	0,40	0,40
215	1,35	1,35	1,35	0,24	0,09	0,24	-0,63	0,24	0,24	0,24
216	0,66	0,66	0,66	0,32	0,17	0,32	-1,14	0,32	0,32	0,32
217	0,40	0,40	0,40	0,12	-0,03	0,12	-1,10	0,12	0,12	0,12
218	0,24	0,24	0,24	-0,24	-0,37	-0,24	-0,77	-0,24	-0,24	-0,24
219	0,32	0,32	0,32	-0,63	-0,74	-0,63	-0,37	-0,63	-0,63	-0,63
220	0,12	0,12	0,12	-1,14	-1,18	-1,14	-0,21	-1,14	-1,14	-1,14
221	-0,24	-0,24	-0,24	-1,10	-1,11	-1,10	-0,25	-1,10	-1,10	-1,10
222	-0,63	-0,63	-0,63	-0,77	-0,77	-0,77	-0,41	-0,77	-0,77	-0,77

Aminoácido	AM162279	AM176759	FJ467503	AF233934	HQ828120	HQ828121	HQ828110	HQ828118	HQ828123	HQ828124
223	-1,14	-1,14	-1,14	-0,37	-0,37	-0,37	-0,40	-0,37	-0,37	-0,37
224	-1,10	-1,10	-1,10	-0,21	-0,21	-0,21	-0,17	-0,21	-0,21	-0,21
225	-0,77	-0,77	-0,77	-0,25	-0,25	-0,25	0,30	-0,25	-0,25	-0,25
226	-0,37	-0,37	-0,37	-0,41	-0,41	-0,41	0,06	-0,41	-0,41	-0,41
227	-0,21	-0,21	-0,21	-0,40	-0,40	-0,40	0,15	-0,40	-0,40	-0,40
228	-0,25	-0,25	-0,25	-0,17	-0,17	-0,17	-0,13	-0,17	-0,09	-0,17
229	-0,41	-0,41	-0,41	0,30	0,30	0,30	-0,25	0,30	0,46	0,30
230	-0,40	-0,40	-0,40	0,06	0,06	0,06	-0,60	0,06	0,62	0,06
231	-0,17	-0,17	-0,17	0,15	0,15	0,15	-0,49	0,15	0,80	0,15
232	0,30	0,30	0,30	-0,13	-0,13	-0,13	-0,73	-0,13	0,60	-0,13
233	0,06	0,06	0,06	-0,25	-0,25	-0,25	-0,45	-0,25	0,48	-0,25
234	0,15	0,15	0,15	-0,60	-0,60	-0,60	-0,43	-0,60	0,13	-0,60
235	-0,13	-0,13	-0,13	-0,49	-0,49	-0,49	-0,05	-0,49	0,24	-0,49
236	-0,25	-0,25	-0,25	-0,73	-0,73	-0,73	0,17	-0,73	0,00	-0,73
237	-0,60	-0,53	-0,60	-0,45	-0,45	-0,45	0,48	-0,45	0,20	-0,45
238	-0,49	-0,35	-0,49	-0,43	-0,43	-0,43	0,79	-0,43	0,14	-0,43
239	-0,73	-0,25	-0,73	-0,05	-0,05	-0,05	1,13	-0,05	0,11	-0,05
240	-0,45	0,10	-0,45	0,17	0,17	0,17	1,31	0,17	0,25	0,17
241	-0,43	0,18	-0,43	0,48	0,48	0,48	1,42	0,48	0,48	0,48
242	-0,05	0,56	-0,05	0,79	0,79	0,79	1,27	0,79	0,79	0,79
243	0,19	0,80	0,19	1,18	1,18	1,18	1,03	1,18	1,18	1,18
244	0,52	1,13	0,52	1,41	1,41	1,41	0,91	1,41	1,41	1,41
245	0,86	1,47	0,86	1,67	1,67	1,67	0,36	1,67	1,67	1,67
246	1,28	1,83	1,28	1,56	1,56	1,56	-0,01	1,56	1,56	1,56
247	1,59	2,07	1,59	1,37	1,37	1,37	-0,04	1,37	1,37	1,37
248	1,86	2,00	1,86	1,25	1,25	1,25	0,06	1,25	1,25	1,25
249	1,78	1,84	1,78	0,70	0,70	0,70	0,10	0,70	0,70	0,70
250	1,59	1,59	1,59	0,33	0,33	0,33	0,31	0,33	0,33	0,33
251	1,46	1,46	1,46	0,30	0,30	0,30	0,23	0,30	0,30	0,30
252	0,90	0,90	0,90	0,35	0,35	0,35	0,39	0,35	0,35	0,35
253	0,51	0,51	0,51	0,34	0,34	0,34	0,42	0,34	0,34	0,34
254	0,44	0,44	0,44	0,40	0,40	0,40	0,92	0,40	0,40	0,40
255	0,46	0,46	0,46	0,28	0,28	0,28	0,77	0,28	0,28	0,28
256	0,38	0,38	0,38	0,39	0,39	0,39	0,33	0,39	0,39	0,39
257	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	-0,22	0,42	0,42	0,42
258	0,28	0,28	0,28	0,92	0,92	0,92	-0,29	0,92	0,92	0,92
259	0,39	0,39	0,39	0,77	0,77	0,77	-0,27	0,77	0,77	0,77
260	0,42	0,42	0,42	0,33	0,33	0,33	-0,15	0,33	0,33	0,33
261	0,92	0,92	0,92	-0,22	-0,22	-0,22	-0,19	-0,22	-0,22	-0,22
262	0,77	0,77	0,77	-0,29	-0,29	-0,27	-0,32	-0,29	-0,29	-0,29
263	0,33	0,33	0,33	-0,27	-0,27	-0,23	-0,67	-0,27	-0,27	-0,27
264	-0,22	-0,22	-0,22	-0,15	-0,15	-0,06	-0,47	-0,15	-0,15	-0,15
265	-0,29	-0,29	-0,29	-0,19	-0,19	-0,09	-0,02	-0,19	-0,19	-0,19
266	-0,27	-0,27	-0,27	-0,32	-0,32	-0,21		-0,32	-0,32	-0,32
267	-0,15	-0,15	-0,15	-0,67	-0,67	-0,54		-0,67	-0,67	-0,67
268	-0,19	-0,19	-0,19	-0,47	-0,47	-0,32		-0,47	-0,47	-0,47
269	-0,32	-0,32	-0,32	-0,02	-0,02	0,16		-0,02	-0,02	-0,02
270	-0,67	-0,67	-0,67							
271	-0,47	-0,47	-0,47							
272	-0,02	-0,02	-0,02							

Aminoácido	EU815935	HQ828119	HQ828116	HQ828125	HQ828127	HQ828128	HQ828130	HQ828131	HQ828136*	HQ828122
1	0,51	0,51	0,51	0,38	0,38	0,91	0,51	0,51	0,41	0,51
2	0,58	0,58	0,58	0,44	0,44	0,96	0,58	0,58	0,46	0,58
3	0,66	0,56	0,56	0,57	0,57	0,93	0,56	0,56	0,53	0,56
4	0,55	0,48	0,48	0,52	0,52	0,76	0,48	0,48	0,49	0,48
5	0,48	0,43	0,43	0,57	0,57	0,54	0,43	0,43	0,63	0,43
6	0,59	0,54	0,54	0,73	0,73	0,67	0,54	0,54	0,83	0,54
7	0,67	0,62	0,62	0,82	0,82	0,67	0,62	0,62	0,98	0,62
8	0,55	0,50	0,50	0,69	0,69	0,51	0,50	0,50	1,00	0,50
9	0,49	0,44	0,44	0,84	0,84	0,56	0,44	0,44	1,01	0,44
10	0,68	0,63	0,63	0,86	0,86	0,39	0,63	0,63	1,27	0,63
11	1,05	0,99	0,99	1,13	1,13	0,56	0,99	0,99	1,74	0,99
12	1,14	1,16	1,16	1,26	1,26	0,80	1,16	1,16	1,92	1,16
13	1,39	1,40	1,40	1,41	1,41	1,31	1,40	1,40	2,21	1,40
14	1,54	1,54	1,54	1,55	1,55	1,89	1,54	1,54	2,41	1,54
15	1,77	1,77	1,77	1,67	1,67	2,17	1,77	1,77	2,62	1,77
16	1,75	1,75	1,75	1,70	1,70	2,36	1,75	1,75	2,57	1,75
17	1,97	1,97	1,97	1,89	1,89	2,67	1,97	1,97	2,65	1,97
18	2,10	2,10	2,10	2,02	2,02	2,75	2,10	2,10	2,73	2,10
19	1,99	1,99	1,99	1,90	1,90	2,76	1,99	1,99	2,56	1,99
20	1,72	1,72	1,72	1,74	1,74	2,65	1,72	1,72	2,06	1,72
21	1,62	1,62	1,62	1,57	1,57	2,44	1,62	1,62	1,87	1,62
22	1,50	1,50	1,50	1,52	1,52	2,10	1,50	1,50	1,67	1,50
23	1,40	1,40	1,40	1,30	1,30	1,68	1,40	1,40	1,29	1,40
24	1,28	1,28	1,28	1,26	1,26	1,49	1,28	1,28	1,13	1,28
25	1,30	1,30	1,30	1,27	1,27	1,34	1,30	1,30	1,09	1,30
26	1,38	1,38	1,38	1,38	1,39	1,13	1,38	1,38	1,18	1,38
27	1,33	1,33	1,33	1,33	1,35	1,06	1,33	1,33	1,14	1,33
28	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,19	1,48	1,48	1,31	1,48
29	1,46	1,46	1,46	1,46	1,48	1,17	1,46	1,46	1,44	1,46
30	1,37	1,37	1,37	1,37	1,41	1,08	1,37	1,37	1,36	1,37
31	1,46	1,46	1,46	1,46	1,50	1,17	1,46	1,46	1,46	1,46
32	1,25	1,25	1,25	1,25	1,29	0,96	1,25	1,25	1,25	1,25
33	1,23	1,23	1,23	1,23	1,27	0,96	1,23	1,23	1,23	1,23
34	1,12	1,12	1,12	1,12	1,15	0,87	1,12	1,12	1,12	1,12
35	0,70	0,70	0,70	0,70	0,73	0,66	0,70	0,70	0,70	0,70
36	0,56	0,56	0,56	0,56	0,58	0,54	0,56	0,56	0,56	0,56
37	0,48	0,48	0,48	0,48	0,52	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
38	0,12	0,12	0,12	0,12	0,15	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
39	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
40	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23
41	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15
42	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20
43	-0,18	-0,18	-0,18	-0,18	-0,18	-0,18	-0,18	-0,18	-0,18	-0,18
44	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
45	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
46	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
47	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
48	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
49	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
50	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59
51	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
52	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
53	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06

Aminoácido	EU815935	HQ828119	HQ828116	HQ828125	HQ828127	HQ828128	HQ828130	HQ828131	HQ828136*	HQ828122
54	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42
55	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46
56	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28
57	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23
58	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12
59	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
60	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06
61	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22
62	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
63	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
64	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
65	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10
66	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62
67	-0,66	-0,66	-0,66	-0,66	-0,66	-0,66	-0,66	-0,66	-0,66	-0,66
68	-0,96	-0,96	-0,96	-0,96	-0,96	-0,96	-0,96	-0,96	-0,96	-0,96
69	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84
70	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55
71	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85
72	-0,91	-0,91	-0,91	-0,91	-0,91	-0,91	-0,91	-0,91	-0,91	-0,91
73	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93
74	-1,11	-1,11	-1,11	-1,11	-1,11	-1,11	-1,11	-1,11	-1,11	-1,11
75	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68
76	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93
77	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62
78	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52
79	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51
80	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37
81	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
82	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
83	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
84	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
85	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57
86	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
87	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02
88	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
89	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
90	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
91	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09
92	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51
93	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84
94	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78
95	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84
96	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50	-0,50
97	-0,44	-0,44	-0,44	-0,44	-0,44	-0,44	-0,44	-0,44	-0,44	-0,44
98	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22
99	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17
100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
101	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
102	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
103	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73
104	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16
105	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
106	1,33	1,33	1,33	1,33	1,33	1,33	1,33	1,33	1,33	1,33

Aminoácido	EU815935	HQ828119	HQ828116	HQ828125	HQ828127	HQ828128	HQ828130	HQ828131	HQ828136*	HQ828122
107	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13
108	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
109	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
110	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
111	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
112	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17
113	-0,61	-0,61	-0,61	-0,61	-0,61	-0,61	-0,61	-0,61	-0,61	-0,61
114	-0,89	-0,89	-0,89	-0,89	-0,89	-0,89	-0,89	-0,89	-0,89	-0,89
115	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98
116	-1,18	-1,18	-1,18	-1,18	-1,18	-1,18	-1,18	-1,18	-1,18	-1,18
117	-1,19	-1,19	-1,19	-1,19	-1,19	-1,19	-1,19	-1,19	-1,19	-1,19
118	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93	-0,93
119	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17
120	-1,04	-1,04	-1,04	-1,04	-1,04	-1,04	-1,04	-1,04	-1,04	-1,04
121	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68
122	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43
123	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25
124	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08
125	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
126	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
127	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
128	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81
129	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21	1,21
130	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35
131	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55
132	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56
133	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52
134	1,29	1,29	1,29	1,29	1,29	1,29	1,29	1,29	1,29	1,29
135	1,24	1,24	1,24	1,24	1,24	1,24	1,24	1,24	1,24	1,24
136	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
137	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
138	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91	0,91
139	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
140	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77
141	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
142	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,85	0,84	0,84	0,84
143	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,97	0,95	0,95
144	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07
145	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,14	1,12	1,12
146	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,11	1,07	1,07	1,07
147	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,86	0,82	0,82
148	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,69	0,66	0,66
149	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,70	0,66	0,66
150	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,63	0,59	0,59
151	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,57	0,54	0,54	0,54
152	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,24	0,22	0,22	0,22
153	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,17	0,13	0,13
154	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,29	0,26	0,26
155	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
156	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
157	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
158	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
159	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37

Aminoácido	EU815935	HQ828119	HQ828116	HQ828125	HQ828127	HQ828128	HQ828130	HQ828131	HQ828136*	HQ828122
160	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
161	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
162	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
163	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
164	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
165	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41
166	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
167	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
168	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68
169	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
170	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06
171	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15
172	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
173	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09
174	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14
175	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
176	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
177	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29
178	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
179	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12
180	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56
181	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46
182	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54
183	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47
184	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62
185	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20
186	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14
187	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
188	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
189	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
190	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
191	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
192	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
193	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51
194	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
195	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09
196	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29
197	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52
198	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19
199	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24
200	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
201	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
202	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
203	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
204	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04
205	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
206	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35
207	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35
208	1,44	1,44	1,44	1,44	1,44	1,44	1,44	1,44	1,44	1,44
209	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60
210	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59
211	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55
212	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35

Aminoácido	EU815935	HQ828119	HQ828116	HQ828125	HQ828127	HQ828128	HQ828130	HQ828131	HQ828136*	HQ828122
213	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66
214	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
215	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
216	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
217	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
218	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24
219	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63
220	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14
221	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10
222	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77
223	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37
224	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21
225	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25
226	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41
227	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40
228	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17
229	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
230	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
231	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
232	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13
233	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25
234	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60
235	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49
236	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73
237	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45
238	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43
239	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05
240	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
241	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
242	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,81	0,79
243	1,13	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18	1,22	1,18
244	1,31	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,49	1,41
245	1,42	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67	1,76	1,67
246	1,27	1,57	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,67	1,56
247	1,03	1,38	1,37	1,37	1,37	1,37	1,37	1,37	1,48	1,37
248	0,91	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,36	1,25
249	0,36	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,81	0,70
250	-0,01	0,34	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,45	0,33
251	-0,04	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,38	0,30
252	0,06	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,42	0,35
253	0,10	0,35	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,37	0,34
254	0,31	0,41	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,42	0,40
255	0,23	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
256	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
257	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
258	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
259	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77
260	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
261	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22
262	-0,29	-0,27	-0,27	-0,29	-0,29	-0,29	-0,27	-0,27	-0,29	-0,27
263	-0,27	-0,23	-0,23	-0,27	-0,27	-0,27	-0,23	-0,23	-0,27	-0,23
264	-0,15	-0,06	-0,06	-0,15	-0,15	-0,15	-0,06	-0,06	-0,15	-0,06
265	-0,19	-0,09	-0,09	-0,19	-0,19	-0,19	-0,09	-0,09	-0,19	-0,09

Aminoácido	EU815935	HQ828119	HQ828116	HQ828125	HQ828127	HQ828128	HQ828130	HQ828131	HQ828136*	HQ828122
266	-0,32	-0,21	-0,21	-0,32	-0,32	-0,32	-0,21	-0,21	-0,32	-0,21
267	-0,67	-0,54	-0,54	-0,67	-0,67	-0,67	-0,54	-0,54	-0,67	-0,54
268	-0,47	-0,32	-0,32	-0,47	-0,47	-0,47	-0,32	-0,32	-0,47	-0,32
269	-0,02	0,16	0,16	-0,02	-0,02	-0,02	0,16	0,16	-0,02	0,16

Aminoácido	AY297819	HQ828111	FJ907331	AM494935	HQ828115	HQ828117	FJ467504	HQ828126	HQ828129	HQ828132
1	-0,07	0,09	0,44	0,64	0,43	1,29	1,07	0,43	0,91	1,29
2	0,16	0,41	0,66	1,00	0,66	1,45	0,70	0,66	1,12	1,45
3	0,40	0,76	0,76	0,98	0,86	1,48	0,69	0,86	1,19	1,48
4	0,74	1,26	0,84	1,11	1,06	1,48	0,65	1,06	1,23	1,48
5	0,82	1,44	0,63	1,09	1,24	1,43	0,62	1,24	1,21	1,43
6	0,98	1,64	0,85	1,28	1,27	1,67	0,80	1,25	1,45	1,67
7	1,21	1,82	1,14	1,41	1,39	1,56	0,85	1,37	1,34	1,56
8	1,29	1,84	1,29	1,44	1,35	1,57	0,75	1,22	1,37	1,57
9	1,37	1,87	1,34	1,42	1,45	1,61	0,87	1,30	1,50	1,61
10	1,65	2,06	1,02	1,57	1,72	1,67	0,89	1,56	1,59	1,67
11	1,71	2,04	0,97	1,64	1,86	1,68	1,39	1,79	1,53	1,68
12	1,71	1,93	0,89	1,75	1,77	1,56	1,68	1,92	1,29	1,56
13	1,42	1,46	0,77	1,75	1,71	1,62	1,94	2,02	1,35	1,62
14	1,54	1,42	1,11	1,61	1,45	1,36	2,20	2,11	1,34	1,36
15	1,55	1,38	1,11	1,75	1,68	1,32	2,40	2,58	1,48	1,32
16	1,76	1,65	1,13	1,74	1,63	1,57	2,46	2,69	1,81	1,57
17	2,03	1,97	1,21	1,93	1,80	1,63	2,62	2,98	1,78	1,63
18	2,06	2,06	1,23	2,04	1,83	1,66	2,60	3,01	1,80	1,66
19	1,99	1,99	1,47	1,92	1,61	1,41	2,37	2,81	1,61	1,41
20	2,00	2,00	1,43	1,79	1,49	1,38	2,17	2,60	1,62	1,38
21	1,89	1,89	1,43	1,73	1,45	1,42	1,91	2,34	1,79	1,42
22	1,92	1,92	1,53	1,62	1,33	1,27	1,72	2,05	1,68	1,27
23	1,71	1,71	1,43	1,67	1,30	1,43	1,45	1,68	1,61	1,43
24	1,68	1,68	1,42	1,55	1,28	1,44	1,30	1,42	1,46	1,44
25	1,51	1,51	1,42	1,50	1,29	1,36	1,25	1,27	1,31	1,36
26	1,42	1,42	1,29	1,40	1,29	1,25	1,25	1,25	1,32	1,25
27	1,30	1,28	1,24	1,33	1,20	1,11	1,18	1,11	1,23	1,11
28	1,27	1,24	1,18	1,42	1,31	1,19	1,31	1,19	1,35	1,19
29	1,21	1,13	1,11	1,32	1,21	1,06	1,27	1,06	1,28	1,06
30	1,21	1,11	1,15	1,22	1,20	1,00	1,26	1,00	1,27	1,00
31	1,26	1,14	0,81	1,26	1,30	1,09	1,33	1,09	1,33	1,09
32	1,00	0,88	0,80	1,02	1,10	0,88	1,12	0,88	1,12	0,88
33	1,00	0,88	0,70	1,02	1,11	0,88	1,11	0,88	1,11	0,88
34	0,94	0,83	0,35	0,92	1,00	0,80	1,01	0,79	1,01	0,80
35	0,60	0,49	0,29	0,57	0,63	0,46	0,66	0,44	0,66	0,46
36	0,56	0,47	0,28	0,48	0,52	0,44	0,59	0,38	0,59	0,44
37	0,52	0,44	-0,01	0,44	0,47	0,44	0,55	0,36	0,55	0,44
38	0,20	0,17	-0,01	0,12	0,17	0,17	0,25	0,09	0,25	0,17
39	0,11	0,10	-0,35	0,08	0,09	0,13	0,17	0,06	0,17	0,13
40	-0,06	-0,06	-0,06	-0,16	-0,20	-0,14	-0,13	-0,22	-0,13	-0,14
41	0,22	0,22	-0,17	0,04	-0,03	0,05	0,05	-0,03	0,05	0,05
42	0,22	0,22	-0,13	0,02	-0,06	0,02	0,02	-0,06	0,02	0,02

Aminoácido	AY297819	HQ828111	FJ907331	AM494935	HQ828115	HQ828117	FJ467504	HQ828126	HQ828129	HQ828132
43	0,35	0,35	0,14	0,05	-0,02	0,05	0,05	-0,02	0,05	0,05
44	0,78	0,78	0,24	0,34	0,28	0,34	0,34	0,28	0,34	0,34
45	0,85	0,85	0,21	0,36	0,35	0,36	0,36	0,35	0,36	0,36
46	0,83	0,83	0,36	0,32	0,31	0,32	0,32	0,31	0,32	0,32
47	0,95	0,95	0,49	0,45	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
48	1,10	1,10	0,79	0,52	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
49	1,20	1,20	0,54	0,72	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78
50	0,95	0,95	0,63	0,57	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
51	0,93	0,93	0,37	0,57	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
52	0,58	0,58	-0,02	0,32	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
53	0,01	0,01	-0,41	-0,10	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06
54	-0,41	-0,41	-0,43	-0,47	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42
55	-0,46	-0,46	-0,24	-0,51	-0,47	-0,46	-0,47	-0,47	-0,46	-0,46
56	-0,29	-0,29	-0,18	-0,34	-0,30	-0,28	-0,30	-0,30	-0,28	-0,28
57	-0,26	-0,26	-0,08	-0,23	-0,36	-0,23	-0,36	-0,36	-0,23	-0,23
58	-0,16	-0,16	0,04	-0,14	-0,27	-0,12	-0,27	-0,27	-0,12	-0,12
59	0,09	0,09	-0,19	0,09	-0,03	0,12	-0,03	-0,03	0,12	0,12
60	-0,09	-0,09	-0,41	-0,09	-0,21	-0,06	-0,21	-0,21	-0,06	-0,06
61	-0,25	-0,25	-0,14	-0,25	-0,37	-0,22	-0,37	-0,37	-0,22	-0,22
62	0,11	0,11	-0,21	0,12	0,00	0,15	0,00	0,00	0,15	0,15
63	0,11	0,11	-0,38	0,13	0,01	0,17	0,01	0,01	0,17	0,17
64	-0,02	-0,02	-0,49	0,15	0,04	0,18	0,04	0,04	0,18	0,18
65	-0,13	-0,13	-0,97	0,07	-0,02	0,10	-0,03	-0,02	0,10	0,10
66	-0,61	-0,61	-0,92	-0,26	-0,25	-0,25	-0,27	-0,25	-0,25	-0,25
67	-0,67	-0,67	-0,94	-0,25	-0,18	-0,25	-0,25	-0,18	-0,25	-0,25
68	-0,93	-0,93	-0,74	-0,48	-0,40	-0,48	-0,48	-0,40	-0,48	-0,48
69	-0,81	-0,81	-0,38	-0,35	-0,26	-0,35	-0,35	-0,26	-0,35	-0,35
70	-0,53	-0,53	-0,59	-0,07	0,03	-0,07	-0,07	0,03	-0,07	-0,07
71	-0,82	-0,82	-0,64	-0,37	-0,28	-0,37	-0,37	-0,28	-0,37	-0,37
72	-0,93	-0,93	-0,55	-0,48	-0,40	-0,48	-0,48	-0,40	-0,48	-0,48
73	-0,86	-0,86	-0,78	-0,56	-0,47	-0,56	-0,56	-0,47	-0,56	-0,56
74	-1,08	-1,08	-0,38	-0,82	-0,74	-0,82	-0,82	-0,74	-0,82	-0,82
75	-0,65	-0,65	-0,73	-0,55	-0,48	-0,55	-0,55	-0,48	-0,55	-0,55
76	-0,89	-0,89	-0,58	-0,85	-0,84	-0,85	-0,85	-0,84	-0,85	-0,85
77	-0,61	-0,61	-0,52	-0,60	-0,59	-0,60	-0,60	-0,59	-0,60	-0,60
78	-0,51	-0,51	-0,64	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51
79	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51
80	-0,37	-0,37	0,03	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37
81	0,09	0,09	0,23	0,09	0,09	0,09	0,09	0,11	0,09	0,09
82	0,20	0,20	0,61	0,20	0,20	0,20	0,20	0,24	0,20	0,20
83	0,56	0,56	0,61	0,56	0,56	0,56	0,56	0,66	0,56	0,56
84	0,45	0,45	0,88	0,45	0,45	0,45	0,45	0,57	0,45	0,45
85	0,56	0,56	0,70	0,56	0,56	0,56	0,56	0,70	0,56	0,56
86	0,30	0,30	0,72	0,30	0,30	0,30	0,30	0,43	0,30	0,30
87	-0,08	-0,08	0,93	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	0,06	-0,08	-0,08
88	-0,03	-0,02	1,08	-0,02	-0,02	-0,03	-0,02	0,12	-0,03	-0,03
89	0,03	0,07	0,96	0,07	0,07	0,03	0,07	0,21	0,03	0,03
90	0,00	0,08	0,71	0,08	0,08	0,00	0,08	0,20	0,00	0,00
91	-0,15	-0,05	0,28	-0,05	-0,05	-0,15	-0,05	0,05	-0,15	-0,15
92	-0,53	-0,41	-0,15	-0,41	-0,41	-0,53	-0,41	-0,38	-0,53	-0,53
93	-0,85	-0,74	-0,23	-0,74	-0,74	-0,85	-0,74	-0,72	-0,85	-0,85
94	-0,78	-0,66	-0,34	-0,66	-0,66	-0,78	-0,66	-0,66	-0,78	-0,78
95	-0,82	-0,71	-0,34	-0,71	-0,71	-0,82	-0,71	-0,71	-0,82	-0,82
96	-0,45	-0,33	-0,34	-0,34	-0,34	-0,45	-0,34	-0,34	-0,45	-0,45

Aminoácido	AY297819	HQ828111	FJ907331	AM494935	HQ828115	HQ828117	FJ467504	HQ828126	HQ828129	HQ828132
97	-0,38	-0,28	-0,30	-0,30	-0,30	-0,39	-0,30	-0,30	-0,39	-0,39
98	-0,15	-0,07	-0,26	-0,21	-0,21	-0,28	-0,21	-0,21	-0,28	-0,28
99	-0,11	-0,08	-0,09	-0,22	-0,22	-0,25	-0,22	-0,22	-0,25	-0,25
100	0,06	0,07	0,02	-0,08	-0,08	-0,09	-0,08	-0,08	-0,09	-0,09
101	0,13	0,13	0,49	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02
102	0,60	0,60	0,60	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
103	0,73	0,73	1,02	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58
104	1,14	1,16	1,15	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01
105	1,26	1,30	1,20	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15
106	1,25	1,33	1,12	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
107	1,03	1,13	1,09	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
108	0,98	1,10	0,80	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06
109	0,69	0,80	0,93	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67
110	0,82	0,93	0,37	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
111	0,26	0,37	-0,17	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
112	-0,28	-0,17	-0,62	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33
113	-0,71	-0,62	-0,90	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78
114	-0,97	-0,90	-1,02	-1,07	-1,06	-1,06	-1,06	-1,06	-1,06	-1,06
115	-1,05	-1,02	-1,21	-1,28	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17
116	-1,23	-1,21	-1,22	-1,46	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36
117	-1,22	-1,22	-0,97	-1,47	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36
118	-0,97	-0,97	-1,21	-1,12	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
119	-1,21	-1,21	-1,07	-1,34	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22
120	-1,07	-1,07	-0,71	-1,19	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07
121	-0,71	-0,71	-0,47	-0,83	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71
122	-0,47	-0,47	-0,28	-0,58	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47
123	-0,28	-0,28	-0,09	-0,38	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28
124	-0,09	-0,09	0,36	-0,10	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09
125	0,36	0,36	0,43	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
126	0,43	0,43	0,55	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
127	0,55	0,55	0,81	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
128	0,81	0,81	1,21	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81
129	1,21	1,21	1,35	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
130	1,35	1,35	1,54	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34
131	1,55	1,55	1,55	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41
132	1,56	1,56	1,38	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42
133	1,52	1,52	1,15	1,37	1,37	1,37	1,37	1,37	1,37	1,37
134	1,29	1,29	1,09	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14
135	1,24	1,24	0,71	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09
136	0,85	0,85	0,80	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
137	0,95	0,95	0,76	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
138	0,91	0,91	0,78	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76
139	0,93	0,93	0,63	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
140	0,77	0,77	0,70	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
141	0,84	0,84	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
142	0,84	0,84	0,95	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
143	0,95	0,95	1,07	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
144	1,07	1,07	1,12	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07
145	1,12	1,12	1,07	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12
146	1,07	1,07	0,82	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07
147	0,82	0,82	0,66	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82
148	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66
149	0,66	0,66	0,59	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66
150	0,59	0,59	0,54	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59

Aminoácido	AY297819	HQ828111	FJ907331	AM494935	HQ828115	HQ828117	FJ467504	HQ828126	HQ828129	HQ828132
151	0,54	0,54	0,22	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54
152	0,22	0,22	0,13	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
153	0,13	0,13	0,26	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
154	0,26	0,26	0,21	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
155	0,21	0,21	0,17	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
156	0,17	0,17	0,36	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
157	0,36	0,36	0,40	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
158	0,40	0,40	0,35	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
159	0,37	0,37	0,05	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
160	0,10	0,10	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
161	0,33	0,33	0,13	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
162	0,34	0,34	-0,09	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
163	0,15	0,15	0,01	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
164	0,25	0,25	0,17	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
165	0,41	0,41	0,19	0,41	0,41	0,41	0,43	0,41	0,41	0,41
166	0,43	0,43	0,21	0,43	0,43	0,43	0,47	0,43	0,43	0,43
167	0,61	0,61	0,14	0,61	0,45	0,61	0,73	0,61	0,61	0,61
168	0,68	0,68	0,07	0,68	0,36	0,68	0,82	0,68	0,68	0,68
169	0,99	0,99	0,10	0,99	0,27	0,99	1,14	0,99	0,99	0,99
170	1,06	1,06	0,05	1,06	0,17	1,06	1,21	1,06	1,06	1,06
171	1,15	1,15	0,04	1,15	0,09	1,15	1,30	1,15	1,15	1,15
172	1,10	1,10	0,05	1,10	0,04	1,10	1,25	1,10	1,10	1,10
173	1,09	1,09	0,13	1,09	0,03	1,09	1,24	1,09	1,09	1,09
174	1,14	1,14	0,05	1,14	0,08	1,14	1,27	1,14	1,14	1,14
175	0,93	0,93	-0,25	0,93	-0,13	0,93	1,04	0,93	0,93	0,93
176	0,44	0,44	-0,17	0,44	-0,46	0,44	0,47	0,44	0,44	0,44
177	0,29	0,29	0,02	0,29	-0,45	0,29	0,31	0,29	0,29	0,29
178	0,07	0,07	-0,01	0,07	-0,26	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
179	-0,12	-0,12	-0,28	-0,12	-0,29	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12
180	-0,56	-0,56	-0,17	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56
181	-0,46	-0,46	-0,28	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46
182	-0,54	-0,54	-0,24	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54
183	-0,47	-0,47	-0,51	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47
184	-0,62	-0,62	-0,14	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62
185	-0,20	-0,20	-0,14	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20
186	-0,14	-0,14	0,04	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14
187	0,04	0,04	0,22	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
188	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
189	0,22	0,22	0,43	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
190	0,43	0,43	0,27	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
191	0,27	0,27	0,34	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
192	0,34	0,34	0,51	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
193	0,51	0,51	0,34	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51
194	0,34	0,34	-0,09	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
195	-0,09	-0,09	-0,29	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09
196	-0,29	-0,29	-0,52	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,21	-0,29	-0,29
197	-0,52	-0,52	-0,19	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,36	-0,52	-0,52
198	-0,19	-0,19	-0,24	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,03	-0,19	-0,19
199	-0,24	-0,24	0,10	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	0,01	-0,24	-0,24
200	0,10	0,10	0,04	0,10	0,10	0,10	0,10	0,43	0,10	0,10
201	0,04	0,04	0,25	0,04	0,04	0,04	0,04	0,38	0,04	0,04
202	0,25	0,25	0,44	0,25	0,25	0,25	0,25	0,59	0,25	0,25
203	0,44	0,44	1,04	0,44	0,44	0,44	0,44	0,78	0,44	0,44
204	1,04	1,04	1,25	1,04	1,04	1,04	1,04	1,38	1,04	1,04

Aminoácido	AY297819	HQ828111	FJ907331	AM494935	HQ828115	HQ828117	FJ467504	HQ828126	HQ828129	HQ828132
205	1,25	1,25	1,35	1,25	1,25	1,25	1,25	1,51	1,25	1,25
206	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,53	1,35	1,35
207	1,35	1,35	1,44	1,35	1,35	1,35	1,35	1,53	1,35	1,35
208	1,44	1,44	1,60	1,44	1,44	1,44	1,44	1,54	1,44	1,44
209	1,60	1,60	1,59	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60
210	1,59	1,59	1,55	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59
211	1,55	1,55	1,35	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55
212	1,35	1,35	0,66	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35
213	0,66	0,66	0,40	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66
214	0,40	0,40	0,24	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
215	0,24	0,24	0,32	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
216	0,32	0,32	0,12	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
217	0,12	0,12	-0,24	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
218	-0,24	-0,24	-0,63	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24
219	-0,63	-0,63	-1,14	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63
220	-1,14	-1,14	-1,10	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14
221	-1,10	-1,10	-0,77	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10
222	-0,77	-0,77	-0,37	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77
223	-0,37	-0,37	-0,21	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37
224	-0,21	-0,21	-0,25	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21
225	-0,25	-0,25	-0,41	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25
226	-0,41	-0,41	-0,40	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41
227	-0,40	-0,40	-0,17	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40
228	-0,17	-0,17	0,28	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17
229	0,30	0,30	0,01	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
230	0,06	0,06	-0,03	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
231	0,15	0,15	-0,34	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
232	-0,13	-0,13	-0,49	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13
233	-0,25	-0,25	-0,84	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25
234	-0,60	-0,60	-0,73	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60
235	-0,49	-0,49	-0,97	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49
236	-0,73	-0,73	-0,70	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73
237	-0,45	-0,45	-0,65	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45
238	-0,43	-0,43	-0,24	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43
239	-0,05	-0,05	0,13	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05
240	0,17	0,17	0,48	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
241	0,48	0,48	0,86	0,52	0,54	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
242	0,79	0,79	1,30	0,84	0,87	0,84	0,86	0,84	0,84	0,84
243	1,13	1,13	1,61	1,20	1,24	1,19	1,22	1,20	1,19	1,19
244	1,31	1,31	1,97	1,41	1,48	1,38	1,47	1,41	1,38	1,38
245	1,42	1,42	1,89	1,52	1,61	1,39	1,49	1,52	1,39	1,39
246	1,27	1,27	1,70	1,37	1,46	1,23	1,34	1,37	1,23	1,23
247	1,03	1,03	1,54	1,13	1,23	0,97	1,09	1,13	0,97	0,97
248	0,91	0,91	0,94	1,01	1,10	0,85	0,96	1,01	0,85	0,85
249	0,36	0,36	0,37	0,44	0,54	0,28	0,40	0,44	0,28	0,28
250	-0,01	-0,01	0,26	0,05	0,13	-0,11	0,01	0,05	-0,11	-0,11
251	-0,04	-0,04	0,19	0,01	0,07	-0,15	-0,06	0,01	-0,15	-0,15
252	0,06	0,06	0,09	0,11	0,17	-0,03	0,05	0,11	-0,03	-0,03
253	0,10	0,10	0,03	0,14	0,17	0,01	0,04	0,14	0,01	0,01
254	0,31	0,31	-0,12	0,39	0,39	0,36	0,38	0,39	0,36	0,36
255	0,23	0,23	-0,02	0,33	0,33	0,32	0,32	0,33	0,32	0,32
256	0,39	0,39	0,03	0,50	0,49	0,50	0,49	0,49	0,50	0,50
257	0,42	0,42	0,55	0,53	0,51	0,53	0,51	0,51	0,53	0,53
258	0,92	0,92	0,63	1,03	0,96	1,03	0,96	0,96	1,03	1,03

Aminoácido	AY297819	HQ828111	FJ907331	AM494935	HQ828115	HQ828117	FJ467504	HQ828126	HQ828129	HQ828132
259	0,77	0,77	0,40	0,89	0,81	0,89	0,81	0,81	0,89	0,89
260	0,33	0,33	-0,02	0,45	0,36	0,45	0,36	0,36	0,45	0,45
261	-0,22	-0,22	-0,04	-0,12	-0,21	-0,12	-0,21	-0,21	-0,12	-0,12
262	-0,29	-0,29	0,02	-0,21	-0,28	-0,20	-0,30	-0,28	-0,20	-0,20
263	-0,27	-0,27	0,18	-0,23	-0,29	-0,20	-0,30	-0,29	-0,20	-0,20
264	-0,15	-0,15	0,22	-0,13	-0,14	-0,05	-0,18	-0,14	-0,05	-0,05
265	-0,19	-0,19	0,16	-0,19	-0,17	-0,09	-0,19	-0,17	-0,09	-0,09
266	-0,32	-0,32	-0,10	-0,32	-0,29	-0,21	-0,30	-0,29	-0,21	-0,21
267	-0,67	-0,67	0,15	-0,67	-0,56	-0,54	-0,58	-0,56	-0,54	-0,54
268	-0,47	-0,47	0,41	-0,47	-0,34	-0,32	-0,36	-0,34	-0,32	-0,32
269	-0,02	-0,02		-0,02	0,16	0,16	0,13	0,16	0,16	0,16

Aminoácido	HQ828133	HQ828134	HQ828135	HQ828112	HQ828113	HQ828129	HQ828130	HQ828114	HQ828139	AM182328	FM244690
1	1,29	0,70	1,29	0,30	0,30	0,88	0,88	0,96	0,96	0,03	0,03
2	1,45	0,96	1,45	-0,03	-0,03	1,06	1,06	1,10	1,10	0,17	0,17
3	1,48	1,06	1,48	0,05	0,05	1,19	1,19	1,12	1,12	0,19	0,19
4	1,48	1,11	1,48	0,15	0,15	1,34	1,34	1,11	1,11	0,48	0,48
5	1,43	1,11	1,43	0,32	0,32	1,38	1,38	1,33	1,33	0,80	0,80
6	1,67	1,39	1,67	0,55	0,55	1,61	1,61	1,56	1,56	1,20	1,19
7	1,56	1,48	1,56	0,65	0,65	1,71	1,71	1,85	1,85	1,43	1,42
8	1,57	1,54	1,57	0,60	0,60	1,66	1,66	1,96	1,96	1,67	1,57
9	1,61	1,61	1,61	0,78	0,78	1,68	1,68	2,11	2,11	1,84	1,73
10	1,67	1,67	1,67	1,01	1,01	1,75	1,75	2,25	2,25	1,88	1,78
11	1,68	1,68	1,68	1,56	1,56	1,90	1,90	2,60	2,60	1,93	1,92
12	1,56	1,56	1,56	1,86	1,86	1,95	1,95	3,01	3,01	2,11	2,19
13	1,62	1,62	1,62	2,07	2,07	1,91	1,91	3,45	3,35	1,97	2,14
14	1,36	1,36	1,36	2,18	2,18	1,61	1,61	3,57	3,39	1,89	1,99
15	1,32	1,32	1,32	2,33	2,33	1,68	1,68	3,85	3,56	1,73	1,85
16	1,57	1,57	1,57	2,34	2,34	1,62	1,62	3,87	3,49	1,55	1,75
17	1,63	1,63	1,63	2,52	2,52	1,79	1,79	3,97	3,48	1,49	1,69
18	1,66	1,66	1,66	2,50	2,50	1,78	1,78	3,88	3,39	1,51	1,59
19	1,41	1,41	1,41	2,36	2,36	1,64	1,64	3,54	3,05	1,75	1,82
20	1,38	1,38	1,38	2,17	2,17	1,44	1,44	3,15	2,66	1,93	1,76
21	1,42	1,42	1,42	1,91	1,91	1,27	1,27	2,68	2,20	2,01	1,74
22	1,27	1,27	1,27	1,72	1,72	1,16	1,16	2,20	1,80	2,09	1,71
23	1,43	1,43	1,43	1,45	1,45	1,30	1,30	1,74	1,43	2,11	1,79
24	1,44	1,44	1,44	1,30	1,30	1,22	1,22	1,46	1,27	2,25	1,94
25	1,36	1,36	1,36	1,25	1,25	1,25	1,25	1,23	1,13	2,30	1,91
26	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,14	1,14	2,16	1,86
27	1,11	1,11	1,11	1,18	1,18	1,18	1,18	1,07	1,07	1,95	1,75
28	1,19	1,19	1,19	1,31	1,31	1,31	1,31	1,20	1,20	1,88	1,71
29	1,06	1,06	1,06	1,27	1,27	1,27	1,27	1,17	1,17	1,76	1,73
30	1,00	1,00	1,00	1,26	1,26	1,26	1,26	1,18	1,18	1,70	1,69
31	1,09	1,09	1,09	1,33	1,33	1,33	1,33	1,30	1,30	1,64	1,64
32	0,88	0,88	0,88	1,12	1,12	1,12	1,12	1,10	1,10	1,53	1,53
33	0,88	0,88	0,88	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11	1,42	1,42
34	0,80	0,80	0,80	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,27	1,27
35	0,46	0,46	0,46	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	1,32	1,32
36	0,44	0,44	0,44	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	1,14	1,14

Aminoácido	HQ828133	HQ828134	HQ828135	HQ828112	HQ828113	HQ828129	HQ828130	HQ828114	HQ828139	AM182328	FM244690
37	0,44	0,44	0,44	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	1,17	1,17
38	0,17	0,17	0,17	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	1,09	1,09
39	0,13	0,13	0,13	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,70	0,70
40	-0,14	-0,14	-0,14	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	0,62	0,62
41	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,56	0,56
42	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,22	0,22
43	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,27	0,27
44	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,04	0,04
45	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,32	0,32
46	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,28	0,28
47	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,29	0,29
48	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,53	0,53
49	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,33	0,33
50	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,24	0,25
51	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,31	0,33
52	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,44
53	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	-0,06	0,49	0,57
54	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	-0,42	0,18	0,27
55	-0,46	-0,46	-0,46	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	0,14	0,23
56	-0,28	-0,28	-0,28	-0,30	-0,30	-0,30	-0,30	-0,30	-0,30	0,02	0,11
57	-0,23	-0,23	-0,23	-0,36	-0,36	-0,36	-0,36	-0,36	-0,36	-0,34	-0,26
58	-0,12	-0,12	-0,12	-0,27	-0,27	-0,27	-0,27	-0,27	-0,27	-0,45	-0,36
59	0,12	0,12	0,12	-0,03	-0,03	-0,03	-0,03	-0,03	-0,03	-0,41	-0,33
60	-0,06	-0,06	-0,06	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,17	-0,10
61	-0,22	-0,22	-0,22	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,04	-0,03
62	0,15	0,15	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,08
63	0,17	0,17	0,17	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,28	0,28
64	0,18	0,18	0,18	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05
65	0,10	0,10	0,10	-0,03	-0,03	-0,03	-0,03	-0,03	-0,03	-0,29	-0,29
66	-0,25	-0,25	-0,25	-0,27	-0,27	-0,27	-0,27	-0,27	-0,27	-0,02	-0,02
67	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,08	-0,08
68	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,15	-0,15
69	-0,35	-0,35	-0,35	-0,35	-0,35	-0,35	-0,35	-0,35	-0,35	-0,27	-0,27
70	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,78	-0,77
71	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,81	-0,79
72	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-1,04	-0,91
73	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,88	-0,73
74	-0,82	-0,82	-0,82	-0,82	-0,82	-0,82	-0,82	-0,82	-0,82	-0,53	-0,37
75	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,55	-0,75	-0,59
76	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,85	-0,81	-0,66
77	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,83	-0,67
78	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-1,05	-0,89
79	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,51	-0,73	-0,59
80	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-1,00	-0,87
81	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	-0,72	-0,69
82	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	-0,62	-0,61
83	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	-0,63	-0,63
84	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,44	0,44	-0,50	-0,50
85	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,53	0,53	-0,16	-0,16
86	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,17	0,17	-0,05	-0,05
87	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,22	-0,22	0,31	0,31
88	-0,03	-0,03	-0,03	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,19	-0,19	0,29	0,29
89	0,03	0,03	0,03	0,07	0,07	0,07	0,07	-0,13	-0,13	0,41	0,41
90	0,00	0,00	0,00	0,08	0,08	0,08	0,08	-0,16	-0,16	0,16	0,16

Aminoácido	HQ828133	HQ828134	HQ828135	HQ828112	HQ828113	HQ828129	HQ828130	HQ828114	HQ828139	AM182328	FM244690
91	-0,15	-0,15	-0,15	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,31	-0,31	-0,17	-0,17
92	-0,53	-0,53	-0,53	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,68	-0,68	-0,09	-0,09
93	-0,85	-0,85	-0,85	-0,74	-0,74	-0,74	-0,74	-1,00	-1,00	0,01	0,01
94	-0,78	-0,78	-0,78	-0,66	-0,66	-0,66	-0,66	-0,91	-0,91	0,13	0,13
95	-0,82	-0,82	-0,82	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71	-0,85	-0,85	0,00	0,00
96	-0,45	-0,45	-0,45	-0,34	-0,34	-0,34	-0,34	-0,47	-0,47	-0,38	-0,38
97	-0,39	-0,39	-0,39	-0,30	-0,30	-0,30	-0,30	-0,39	-0,39	-0,71	-0,71
98	-0,28	-0,28	-0,28	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,28	-0,28	-0,63	-0,63
99	-0,25	-0,25	-0,25	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,25	-0,25	-0,67	-0,67
100	-0,09	-0,09	-0,09	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,09	-0,09	-0,33	-0,33
101	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,30	-0,30
102	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	-0,22	-0,22
103	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	-0,23	-0,23
104	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	-0,08	-0,08
105	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	0,02	0,02
106	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	0,49	0,49
107	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	0,60	0,60
108	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,00	1,00
109	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	1,12	1,12
110	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	1,12	1,12
111	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	1,02	1,02
112	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33	0,98	0,98
113	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	-0,78	0,69	0,69
114	-1,06	-1,06	-1,06	-1,06	-1,06	-1,06	-1,06	-1,06	-1,06	0,82	0,82
115	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	-1,17	0,26	0,26
116	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-0,28	-0,28
117	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-1,36	-0,77	-0,77
118	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,08	-1,08
119	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22	-1,39	-1,39
120	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07	-1,63	-1,63
121	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71	-1,68	-1,68
122	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-1,43	-1,43
123	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-1,66	-1,66
124	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-1,53	-1,53
125	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	-1,17	-1,17
126	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	-0,87	-0,87
127	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	-0,62	-0,62
128	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	-0,19	-0,19
129	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	0,31	0,31
130	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	0,43	0,43
131	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	0,55	0,55
132	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42	0,83	0,83
133	1,37	1,37	1,37	1,37	1,37	1,37	1,37	1,37	1,37	1,24	1,24
134	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,40	1,40
135	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,61	1,61
136	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,69	0,70	1,65	1,65
137	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,78	0,80	1,61	1,61
138	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,77	0,76	1,39	1,39
139	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,78	0,79	1,36	1,36
140	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,71	0,75	0,98	0,98
141	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,79	0,83	1,05	1,05
142	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,80	0,84	0,97	0,97
143	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,91	0,95	0,94	0,94
144	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,03	1,07	0,73	0,73

Aminoácido	HQ828133	HQ828134	HQ828135	HQ828112	HQ828113	HQ828129	HQ828130	HQ828114	HQ828139	AM182328	FM244690
145	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,09	1,12	0,76	0,76
146	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,06	1,07	0,77	0,77
147	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,78	0,82	0,89	0,89
148	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,63	0,66	0,98	0,98
149	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,98	0,98
150	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,72	0,72
151	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,43	0,43
152	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,26	0,26
153	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,28	0,28
154	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,23	0,23
155	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,17	0,17
156	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	-0,16	-0,16
157	0,36	0,36	0,36	0,36	0,28	0,36	0,36	0,36	0,36	-0,25	-0,25
158	0,40	0,40	0,40	0,40	0,33	0,40	0,40	0,40	0,40	-0,06	-0,06
159	0,37	0,37	0,37	0,37	0,32	0,37	0,37	0,37	0,37	0,21	0,21
160	0,10	0,10	0,10	0,10	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10	0,23	0,23
161	0,33	0,33	0,33	0,33	0,28	0,33	0,33	0,33	0,33	0,47	0,47
162	0,34	0,34	0,34	0,34	0,29	0,34	0,34	0,34	0,34	0,51	0,51
163	0,15	0,15	0,15	0,15	0,10	0,15	0,15	0,15	0,15	0,46	0,46
164	0,25	0,25	0,25	0,25	0,21	0,25	0,25	0,25	0,25	0,15	0,15
165	0,41	0,41	0,41	0,41	0,36	0,41	0,41	0,41	0,41	0,25	0,25
166	0,43	0,43	0,43	0,43	0,46	0,43	0,43	0,43	0,43	0,10	0,10
167	0,61	0,61	0,61	0,61	0,63	0,61	0,61	0,61	0,61	-0,13	-0,13
168	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	-0,13	-0,13
169	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,02	0,02
170	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	0,04	0,04
171	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	0,06	0,06
172	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	-0,01	-0,01
173	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	-0,07	-0,07
174	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	-0,04	-0,04
175	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,04	0,04
176	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,03	0,03
177	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,03	0,03
178	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08
179	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,12	-0,13	-0,13
180	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,56	-0,46	-0,46
181	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,45	-0,45
182	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,54	-0,26	-0,26
183	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,47	-0,29	-0,29
184	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,62	-0,56	-0,56
185	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,46	-0,46
186	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	-0,54	-0,54
187	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	-0,47	-0,47
188	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	-0,62	-0,62
189	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	-0,20	-0,20
190	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	-0,14	-0,14
191	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,04	0,04
192	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,22	0,22
193	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,22	0,22
194	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,43	0,43
195	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	0,27	0,27
196	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	-0,29	0,34	0,34
197	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	-0,52	0,51	0,51
198	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	0,34	0,34

Aminoácido	HQ828133	HQ828134	HQ828135	HQ828112	HQ828113	HQ828129	HQ828130	HQ828114	HQ828139	AM182328	FM244690
199	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,09	-0,09
200	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	-0,29	-0,29
201	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	-0,52	-0,52
202	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-0,19	-0,19
203	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	-0,24	-0,24
204	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	0,10	0,10
205	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	0,04	0,04
206	1,35	1,35	1,35	1,35	1,39	1,35	1,35	1,35	1,35	0,25	0,25
207	1,35	1,35	1,35	1,35	1,42	1,35	1,35	1,35	1,35	0,44	0,44
208	1,44	1,44	1,44	1,44	1,73	1,44	1,53	1,44	1,44	1,04	1,04
209	1,60	1,60	1,60	1,60	1,92	1,60	1,69	1,60	1,60	1,25	1,25
210	1,59	1,59	1,59	1,59	1,95	1,59	1,69	1,59	1,59	1,35	1,35
211	1,55	1,55	1,55	1,55	1,91	1,55	1,64	1,55	1,55	1,35	1,35
212	1,35	1,35	1,35	1,35	1,71	1,35	1,45	1,35	1,35	1,44	1,44
213	0,66	0,66	0,66	0,66	1,02	0,66	0,76	0,66	0,66	1,60	1,60
214	0,40	0,40	0,40	0,40	0,76	0,40	0,50	0,40	0,40	1,59	1,59
215	0,24	0,24	0,24	0,24	0,56	0,24	0,33	0,24	0,24	1,55	1,55
216	0,32	0,32	0,32	0,32	0,60	0,32	0,41	0,32	0,32	1,35	1,35
217	0,12	0,12	0,12	0,12	0,20	0,12	0,13	0,12	0,12	0,66	0,66
218	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,21	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	0,40	0,40
219	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	-0,63	0,24	0,24
220	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	-1,14	0,32	0,32
221	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	-1,10	0,12	0,12
222	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,24	-0,24
223	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,37	-0,63	-0,63
224	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-1,14	-1,14
225	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-1,10	-1,10
226	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,41	-0,77	-0,77
227	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,40	-0,37	-0,37
228	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17	-0,21	-0,21
229	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	-0,25	-0,25
230	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	-0,41	-0,41
231	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	-0,40	-0,40
232	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,13	-0,17	-0,17
233	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	0,28	0,28
234	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60	0,01	0,01
235	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,50	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,03	-0,03
236	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73	-0,78	-0,73	-0,73	-0,73	-0,73	-0,34	-0,34
237	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,52	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,49	-0,49
238	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,50	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43	-0,84	-0,84
239	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,12	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,73	-0,73
240	0,19	0,19	0,19	0,19	0,11	0,19	0,19	0,19	0,19	-0,97	-0,97
241	0,52	0,52	0,52	0,52	0,45	0,52	0,52	0,54	0,54	-0,70	-0,70
242	0,84	0,84	0,84	0,84	0,76	0,84	0,84	0,89	0,89	-0,65	-0,65
243	1,19	1,19	1,19	1,20	1,13	1,20	1,20	1,28	1,28	-0,24	-0,24
244	1,38	1,38	1,38	1,41	1,35	1,41	1,41	1,56	1,56	0,12	0,11
245	1,39	1,39	1,39	1,52	1,50	1,52	1,52	1,71	1,71	0,49	0,45
246	1,23	1,23	1,23	1,37	1,36	1,37	1,37	1,58	1,58	0,86	0,81
247	0,97	0,97	0,97	1,13	1,13	1,13	1,13	1,34	1,34	1,28	1,22
248	0,85	0,85	0,85	1,01	1,01	1,01	1,01	1,22	1,22	1,59	1,50
249	0,28	0,28	0,28	0,44	0,44	0,44	0,44	0,65	0,65	1,86	1,77
250	-0,11	-0,11	-0,11	0,05	0,05	0,05	0,05	0,25	0,25	1,78	1,68
251	-0,15	-0,15	-0,15	0,01	0,01	0,01	0,01	0,16	0,16	1,59	1,49
252	-0,03	-0,03	-0,03	0,11	0,11	0,11	0,11	0,24	0,24	1,46	1,37

Aminoácido	HQ828133	HQ828134	HQ828135	HQ828112	HQ828113	HQ828129	HQ828130	HQ828114	HQ828139	AM182328	FM244690
253	0,01	0,01	0,01	0,14	0,14	0,14	0,14	0,20	0,20	0,90	0,82
254	0,36	0,36	0,36	0,39	0,39	0,39	0,39	0,41	0,41	0,51	0,45
255	0,32	0,32	0,32	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,44	0,39
256	0,50	0,50	0,50	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,46	0,43
257	0,53	0,53	0,53	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,38	0,38
258	1,03	1,03	1,03	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,42	0,42
259	0,89	0,89	0,89	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,28	0,28
260	0,45	0,45	0,45	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,39	0,39
261	-0,12	-0,12	-0,12	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	-0,21	0,42	0,42
262	-0,20	-0,20	-0,20	-0,30	-0,30	-0,30	-0,30	-0,28	-0,28	0,92	0,84
263	-0,20	-0,20	-0,20	-0,30	-0,30	-0,30	-0,30	-0,27	-0,29	0,77	0,71
264	-0,05	-0,05	-0,05	-0,18	-0,18	-0,18	-0,18	-0,10	-0,13	0,33	0,28
265	-0,09	-0,09	-0,09	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,09	-0,13	-0,22	-0,27
266	-0,21	-0,21	-0,21	-0,30	-0,30	-0,30	-0,30	-0,19	-0,37	-0,29	-0,34
267	-0,54	-0,54	-0,54	-0,58	-0,58	-0,58	-0,58	-0,45	-0,41	-0,25	-0,30
268	-0,32	-0,32	-0,32	-0,36	-0,36	-0,36	-0,36	-0,21	-0,04	-0,11	-0,16
269	0,16	0,16	0,16	0,13	0,13	0,13	0,13	0,31	0,31	-0,11	-0,16
270										-0,22	-0,28
271										-0,56	-0,53
272										-0,35	-0,33
273										0,13	0,13