



INSTITUTO CAVANILLES DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Efectos Mutacionales, Evolución y Adaptación en
Bacteriófagos de RNA y DNA de Cadena Sencilla**

Pilar Domingo Calap

2012

Programa Oficial de Postgrado en Biodiversidad

Director: **Rafael Sanjuán Verdeguer**

Memoria presentada por Pilar Domingo Calap para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Valencia.

Pilar Domingo Calap.



Este trabajo ha sido dirigido por el Doctor Rafael Sanjuán Verdeguer.

VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Rafael Sanjuán Verdeguer.

ÍNDICE

PRÓLOGO	5
INTRODUCCIÓN	9
Mecanismos evolutivos básicos:mutación, selección y deriva genética	11
Evolución experimental y virus	16
Mutación y evolución virales	18
Distribución de efectos mutacionales en virus.....	23
Sistema experimental: bacteriófagos de RNA y DNA de cadena sencilla.....	25
Objetivos	27
METODOLOGÍA	29
Pases seriados de evolución	31
<i>Experimentos de adaptación</i>	31
<i>Experimentos de acumulación de mutaciones</i>	31
Determinación de la eficacia viral	32
<i>Ensayos de crecimiento</i>	32
<i>Ensayos de competencia en ΦX174</i>	33
Estimas de frecuencias de mutación	34
Mutagénesis química	35
<i>Ácido nítrico</i>	35
<i>5-Fluorouracilo</i>	35
Mutagénesis dirigida	36
<i>Obtención de mutantes</i>	36
<i>Demostración del efecto letal de una mutación</i>	38
<i>Determinación de la fiabilidad de la técnica</i>	38
Análisis de secuencias.....	39
RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL	41
Adaptación preliminar	43
Acumulación de mutaciones	44
Recuperación de eficacia.....	50
Distribución de efectos mutacionales	60
<i>Mutaciones aleatorias</i>	60
<i>Mutaciones sinónimas</i>	63
Tasas óptimas de mutación	65
Mutagénesis química en un virus de ssDNA	66
Discusión general.....	74
CONCLUSIONES FINALES	85
BIBLIOGRAFÍA	89
INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	107

PRÓLOGO

No quisiera comenzar sin antes agradecer a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han hecho posible mi trabajo durante estos últimos años. En primer lugar mencionar a Amparo Latorre, quien me invitó a formar parte del Instituto Cavanilles, recomendándome trabajar junto a un reconocido grupo de investigación bajo las directrices de Andrés Moya, con quién comencé mis andaduras en la genética de poblaciones, y gracias al cuál terminé realizando esta tesis con mi director, Rafa Sanjuán, al que quiero agradecer enormemente por haberme enseñado tantas cosas y sin el cuál, esta tesis no habría podido llevarse a cabo. También quiero mencionar a aquellas personas que han estado ayudándome en el día a día, sobre todo a las técnicas, en especial a Yolanda, Ana, Conxa, y Loles. A mis compañeros y compañeras del laboratorio, Joan, Marianoel y José; y a toda la gente del Cavanilles, con mención especial a Vanesa, Elisa y Carmen, por escucharme tantas veces y por todos esos buenos ratos que hemos pasado juntas. También quiero mencionar a Matteo Negroni y a mis compañeras y amigas de Estrasburgo. Y como no, a la Generalitat Valenciana y a la Consellería de Educación por la beca que me ha permitido llevar a cabo mi investigación durante estos años.

También quisiera destacar a la gente, que sin trabajar codo con codo, han estado ahí. A mis amigas y amigos, a Elena, Irene, Aida, y Marta, y sobre todo a mi familia, a mi padre y a mi madre, por todo lo que me han enseñado, ayudado, y apoyado para continuar en los momentos difíciles, y junto con mis hermanos, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos estos años.

Espero seguir en un futuro igual o mejor que hasta ahora, afrontando nuevos retos e intentando superarme día a día.

Relación de artículos publicados a partir de los datos y resultados obtenidos en la presente tesis:

- **Domingo-Calap, P.**, J.M. Cuevas, R. Sanjuán. 2009. The fitness effects of random mutations in single-stranded DNA and RNA bacteriophages. **PLoS Genetics** e1000742.
- **Domingo-Calap, P.**, R. Sanjuán. 2011. Experimental evolution of RNA versus DNA viruses. **Evolution** 65:2987-2994.
- Cuevas, J.M.; **P. Domingo-Calap**, R. Sanjuán. 2012. The fitness effects of synonymous mutations in viruses. **Molecular Biology and Evolution** 29: 17-20.
- **Domingo-Calap, P.**, R. Sanjuán. 2012. Nucleoside analogue mutagenesis of a single-stranded DNA virus: evolution and resistance. **Journal of Virology** En revisión.

Otros artículos relacionados:

- Cuevas, J.M., **P. Domingo-Calap**, M. Pereira-Gómez, R. Sanjuán. 2009. Experimental Evolution and Population Genetics of RNA Viruses. **The Open Evolution Journal** 3:9-16.
- **Domingo-Calap, P.**, M. Pereira-Gómez, R. Sanjuán. 2010. Selection for thermostability can lead to the emergence of mutational robustness in an RNA virus. **Journal of Evolutionary Biology** 23:2453-2460.
- **Domingo-Calap, P.**, R. Sanjuán. 2011. Experimental evolution in viruses. En: **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley and sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0022857.

INTRODUCCIÓN

Mecanismos evolutivos básicos: mutación, selección y deriva genética

La mutación es la última fuente de variación genética, sobre la que la selección natural, la deriva genética aleatoria, el flujo génico y la recombinación, actúan para modelar la estructura genética de las poblaciones. El efecto fenotípico de las mutaciones es aleatorio y dependiendo de estos factores, las mutaciones pueden eliminarse de la población, o pueden llegar a imponerse (“fijarse”). Por tanto, la evolución puede dividirse en dos procesos, el origen de la variación y la fijación de cambios. El estudio de estos procesos se lleva a cabo sobre las poblaciones. Éstas son entidades finitas y, cuando su tamaño es pequeño, el cambio de las frecuencias genotípicas en la población puede ser producto del azar, lo que se denomina deriva genética aleatoria; pero cuando los tamaños poblacionales son elevados, la selección natural actúa modificando las frecuencias de forma no aleatoria, adaptando la población al ambiente.

Un parámetro evolutivo relevante a la hora de estudiar los mecanismos evolutivos es la eficacia biológica (W), que puede definirse como el número de descendientes con que un individuo contribuye a la siguiente generación. Puesto que se mide sobre los fenotipos, va a tener un componente ambiental y un componente genético. Generalmente, la eficacia se calcula en relación a un genotipo de referencia en un ambiente dado. El cambio en la eficacia producido por una mutación viene representado por el coeficiente de selección, definido como $s = W - 1$. Tanto el coeficiente de selección medio de las mutaciones como su varianza y, en general, su distribución estadística, son relevantes para entender procesos evolutivos como la evolución neutral (Ohta 1992), el equilibrio mutación-selección (Haldane 1937), los procesos de pérdida de eficacia (Butcher 1995; Lynch y col. 1993), o el origen del sexo y la recombinación (Peck y col. 1997; de Visser y col. 2003), entre otros. Además, es de gran relevancia para muchos campos como el conocimiento de las enfermedades humanas complejas (Eyre-Walker y col. 2006) o la conservación genética (Schultz y Lynch 1997).

Un concepto central que tiene relación directa con los coeficientes de selección es la robustez genética o robustez mutacional. Puede definirse como la capacidad de un genotipo para mantener su eficacia biológica a pesar de la mutación, es decir, la capacidad de tolerar mutaciones. La robustez mutacional puede medirse, por ejemplo, como el efecto promedio de las mutaciones, es decir $1 - E(s)$, siendo $E(s)$ el coeficiente medio de selección. La redundancia genética es quizás la manera más sencilla y directa de obtener robustez genética, y puede alcanzarse mediante duplicación de genes, o poliploidías. Otra manera es el establecimiento de una red de interacciones entre genes (Wagner 2000). La redundancia y la robustez genéticas crecen con la complejidad de los organismos, por lo que es típica de eucariotas. En bacterias y virus, es más típica la “anti-redundancia” (Krakauer y Plotkin 2002), con ejemplos como la haploidía, las pautas solapadas, los elementos de regulación de la expresión compartidos (Krakauer 2000), o el sesgo en la utilización de codones (Berg y Silva 1997).

En la evolución adaptativa las mutaciones beneficiosas son el motor de la evolución. Un modelo clásico de adaptación es el modelo geométrico de Fisher (Fisher 1930), basado en que los cambios de pequeño efecto tienen una probabilidad mayor de resultar beneficiosos que aquellos cambios con mayor efecto. Como consecuencia de ello, la adaptación debe ocurrir de manera gradual mediante la fijación de mutaciones de pequeño efecto que acercarán a las poblaciones hacia el óptimo. Sin embargo, todas las mutaciones (aun siendo beneficiosas) tienen una frecuencia inicial pequeña y están pues sujetas a pérdida por la deriva genética, siendo la probabilidad de superar esta fase inicial dependiente del coeficiente de selección y del tamaño de la población (Haldane 1927; Peck 1994; Wilke 2003). Combinando este cribado inicial con el modelo de Fisher, cabría esperar que sean las mutaciones beneficiosas de efecto intermedio las que más contribuyan a la adaptación (Kimura 1985). Además, la tasa de adaptación debería disminuir conforme la población aumenta su adaptación, bien sea por la menor disponibilidad de mutaciones beneficiosas o por su menor efecto. Se tendería así a un límite en el que la población alcanzaría una meseta de eficacia, aunque cabe destacar que el límite es asintótico. En cualquier caso, la tasa de adaptación está relacionada positivamente con el tamaño poblacional, porque el

número de mutaciones beneficiosas producido por unidad de tiempo incrementa de forma lineal con el tamaño poblacional. De todos modos, cabe resaltar que en ausencia de recombinación el incremento de eficacia puede presentar un rendimiento decreciente (Arjan y col. 1999; Miralles y col. 2000; Elena y Lenski 2003), ya que a elevados tamaños poblacionales, distintas mutaciones beneficiosas pueden aparecer al mismo tiempo en distintos fondos genéticos y tendrán que competir entre ellas en su camino hacia la fijación. Estas mutaciones ventajosas deberían combinarse en el mismo genotipo, ya que si no es así, durante esa competencia algunas van a ser eliminadas de la población, retardando la adaptación (Gerrish y Lenski 1998). Este proceso de interferencia impone pues un límite adaptativo. En suma, en especies donde no se dan procesos de recombinación, las mutaciones beneficiosas deben incorporarse de manera secuencial (Fisher 1930; Muller 1964; Crow y Kimura 1965).

Frente al pensamiento evolutivo dominado por la selección natural y la adaptación, Kimura introdujo un nuevo concepto de evolución neutral (Kimura 1983), donde propuso la acción de la deriva genética como el motor principal de la evolución. Como se ha comentado, la intensidad de la deriva genética depende fundamentalmente del tamaño poblacional, aunque existen múltiples factores implicados, como por ejemplo la historia demográfica, el modo de reproducción, el desequilibrio de ligamiento, o la propia selección natural. Por ello, para conocer la acción de la deriva en una determinada población, generalmente se utiliza el tamaño poblacional efectivo (N_e), un parámetro que resume la cantidad de deriva que sufre una población. Bajo un modelo de evolución estrictamente neutral, todos los alelos tienen la misma probabilidad de fijación, siendo ésta igual a la frecuencia del alelo. Por lo tanto, cada nueva mutación en una población haploide de tamaño N tendrá una probabilidad de fijación $1/N$. Por otro lado, el aporte de mutantes por generación será UN (siendo U la tasa de mutación). Así pues, la tasa de evolución neutral será $K = UN/N = U$ (Kimura 1968). Aunque obviamente, no todos los genotipos de una población tienen la misma eficacia, y por lo tanto, la neutralidad estricta no se cumple. Las mutaciones se comportarán de manera efectivamente neutral sólo si la intensidad de la deriva es mayor que la intensidad de la selección, es decir si $N_e \times s < 1$ (Ohta 1992). Cuando N_e es pequeño, mutaciones deletéreas pueden alcanzar la fijación por deriva

genética al comportarse como efectivamente neutras. En este contexto, y si se considera el genoma completo, es posible que los individuos sin mutaciones deletéreas sean escasos. Si éstos no dejan descendencia, tendría lugar una acumulación de mutaciones, aunque podría revertirse por recombinación. Por ello, las poblaciones asexuales son especialmente sensibles a la acumulación secuencial de mutaciones deletéreas a bajo tamaño poblacional, proceso conocido como trinquete de Muller (Muller 1964). Al aumentar N_e , el trinquete se detiene y las mutaciones previamente fijadas vuelven a ser visibles a la selección. Se espera entonces que la población recupere su eficacia, y en general, a mayor pérdida de eficacia, más rápida es la recuperación (Elena y col. 1998). Es posible entonces que las mutaciones deletéreas reviertan, pero también puede que otras mutaciones secundarias actúen compensando el efecto deletéreo. Este segundo caso es un tipo particular de epistasia o interacción entre loci.

Puesto que la mayoría de las mutaciones con efectos sobre la eficacia son deletéreas (Bell 1997; Eyre-Walker y Keightley 2007), la selección natural tiende a favorecer a aquellos individuos que generan menos mutaciones, es decir, que la selección tiende hacia una reducción de la tasa de mutación. Sin embargo, puesto que los efectos de las mutaciones son aleatorios, también quedará reducido el aporte de mutaciones beneficiosas por unidad de tiempo. Así pues, la selección natural en contra de las mutaciones deletéreas disminuiría la adaptabilidad de las poblaciones. Por otro lado, si en una población la tasa de mutación aumentase de manera incontrolada, la carga genética asociada también aumentaría, y esto dificultaría la evolución o incluso llevaría a la extinción. Debido a ello, tanto la tasa de evolución como la de adaptación deben ser maximizadas para algún valor intermedio de tasa de mutación. Puesto que la selección actúa a corto plazo, y la mayoría de las mutaciones son deletéreas, es posible que la selección no haya permitido a las poblaciones naturales encontrar ese óptimo, sino que las haya conducido hacia tasas de mutación subóptimas (Sniegowski y col. 2000; Orr 2000). Sin embargo, esta posibilidad no ha sido contrastada empíricamente e incluso se desconoce el valor óptimo de la tasa de mutación en la mayoría de casos.

Una forma de visualizar la evolución de las poblaciones son los paisajes adaptativos de Wright (Wright 1932). Según este modelo, los organismos pueden situarse de forma abstracta sobre un espacio de secuencia y representarse gráficamente. Para ello, los diferentes genotipos se representan en una o dos dimensiones, y en otra dimensión (generalmente en el eje de ordenadas), la eficacia de cada genotipo (altura del paisaje). En la figura 1 se pueden observar diferentes picos adaptativos, dando lugar a un paisaje rugoso. Los distintos picos presentan diferentes alturas dependiendo de la eficacia de cada genotipo, siendo los picos más altos los de mayor

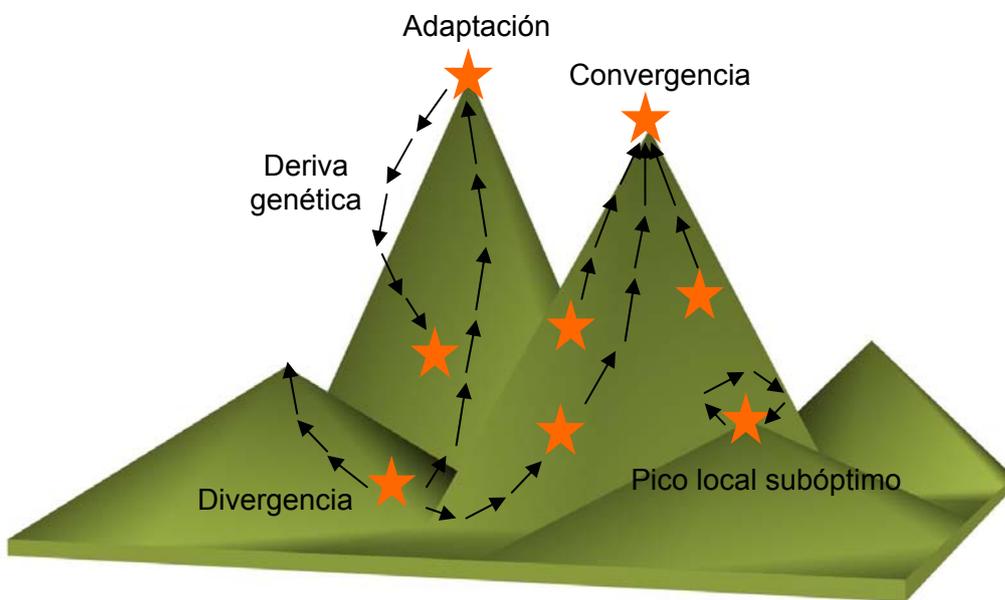


Figura 1. Evolución en un paisaje adaptativo de Wright. Se representa un paisaje rugoso con diferentes picos de adaptación. La selección natural va a favorecer ascender hacia picos de alta eficacia, mientras que la deriva génica y otros procesos pueden llevar a descensos de eficacia y por tanto, a alejarse del óptimo (adaptado de Sanjuán y Domingo-Calap 2011).

eficacia. En presencia de deriva genética, las poblaciones tienden a acumular mutaciones de manera aleatoria, y por tanto a divergir, permitiendo que cada población atravesase valles. Al aumentar el tamaño poblacional, se retorna a un estado en el que la selección natural prevalece frente a la deriva. En este momento, la población se va a conducir hacia una recuperación de eficacia, y por tanto, un ascenso de un pico adaptativo, pudiendo quedar atrapada en un pico distinto del que provenía. Puesto que la deriva tiende a conducir a las poblaciones hacia los valles, permitiría favorecer la transición de un pico a otro (teoría del equilibrio cambiante; Wright 1982), ya que pasar de unos picos a otros sin pasar por los valles de baja eficacia resulta complicado (varias mutaciones beneficiosas tendrán que ocurrir a la vez). Esto mismo puede ocurrir mediante cambios ambientales, ya que modifican la topografía del paisaje. Además, diferentes poblaciones alopátricas pueden ascender distintos picos adaptativos incrementando la variabilidad genética. Si en algún momento distintas poblaciones entran en contacto, aquellas que han ascendido a picos más elevados desplazarán a las demás.

Evolución experimental y virus

La evolución experimental es conceptualmente sencilla y una herramienta flexible que nos permite ir desde el nivel molecular hasta el propio ecosistema, además de testar hipótesis bajo condiciones controladas, y por tanto, validar o refutar teorías mediante la observación directa (Bell 1997). Organismos pequeños y con cortos tiempos de generación son adecuados para llevar a cabo evolución experimental e intentar comprender aspectos fundamentales de la evolución a todos los niveles. Algunas ventajas de trabajar con microorganismos son que replican muy rápido, alcanzan elevados tamaños poblacionales y, en ocasiones, presentan altas tasas de mutación, lo que les permite evolucionar rápidamente y mostrarnos a corto plazo qué sucede en un proceso adaptativo concreto. Además, son sencillos de manipular y pueden ser

guardados en el congelador sin pérdidas significativas de viabilidad, lo que nos permite además tener un “registro fósil viviente” para preservar las muestras y poder comparar diferentes estadios de la evolución, tanto a nivel fenotípico como molecular (Elena y Lenski 2003; Buckling y col. 2009). Experimentos en los que la evolución tiene lugar a tiempo real pueden ayudarnos a establecer relaciones causa-efecto que son difíciles de inferir a partir del estudio de poblaciones naturales.

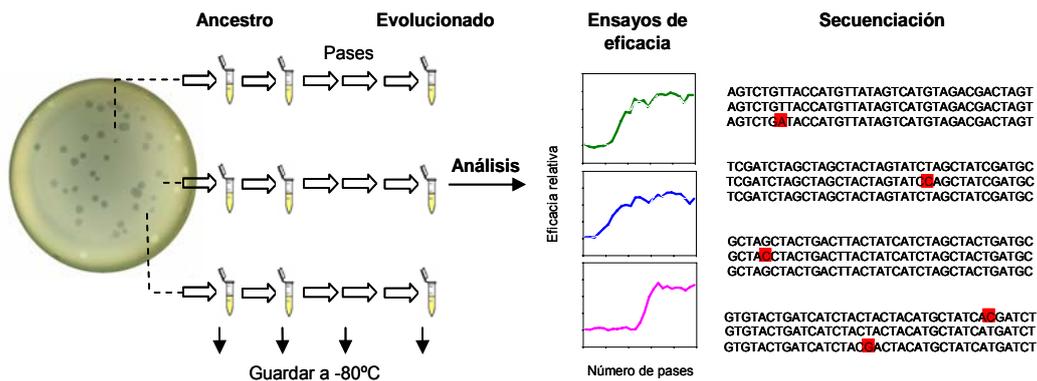


Figura 2. Protocolo típico de un experimento de evolución con virus (adaptado de Sanjuán y Domingo-Calap 2011).

La sencillez, rapidez evolutiva y relevancia biomédica de los virus los hace particularmente interesantes como sistema modelo para estudios de evolución experimental (Sanjuán y Domingo-Calap 2011). Los virus son parásitos obligados y pueden infectar bacterias, plantas o animales, bajo una gran variedad de condiciones. En el laboratorio, pueden estudiarse tanto *in vivo*, como *ex vivo*, o *in vitro*, y pueden usarse para testar hipótesis genético-poblacionales, estudiar las bases genéticas de la evolución, o predecir cambios evolutivos en la naturaleza. En la figura 2 se muestra un ejemplo esquemático de estudios típicos de adaptación viral a un determinado

ambiente. Además del estudio de conceptos básicos como mutación, adaptación o deriva genética, los virus pueden utilizarse para entender mejor la emergencia de resistencias frente a fármacos (Vella y Palmisano 2005; Pond y col. 2012), explorar nuevas estrategias antivirales (Schinazi y Prusoff 1981; Prusoff y col. 1989; Sarrazin y col. 2012), crear mejores vacunas atenuadas (van der Noordaa y col. 1967; Jordan y col. 2011; Kan y col. 2012), o incluso su uso como agentes antitumorales (Chen y col. 2011; Parato y col. 2011; Ferguson y col. 2012; Auer y Bell 2012).

Mutación y evolución virales

Las tasas de mutación van a depender, en gran medida, de las enzimas que intervienen en la replicación del genoma. Los virus de RNA utilizan RNA polimerasas RNA dependientes (RdRps), los retrovirus usan retro-transcriptasas (RT), y los virus de DNA utilizan DNA polimerasas. Las RdRp y las RT presentan las mayores tasas de mutación (Flint y col. 2004) debido a la ausencia de actividad correctora 5' exonucleasa. Esta actividad sí está presente en las DNA polimerasas, y reduce la tasa de mutación durante la replicación al menos un orden de magnitud (García-Díaz y Bebenek 2007). Además, en el DNA de doble cadena (dsDNA) existen sistemas de reparación de errores mediante escisión de bases desapareadas, cosa que no ocurre en el RNA o en heterodúplex de RNA-DNA (García-Díaz y Bebenek 2007). Otros procesos que afectan a las tasas de mutación son la oxidación y metilación de bases (Drake 1993), la desaminación de bases nitrogenadas desapareadas (Domingo 1997; Walsh y Xu 2006), la formación de estructuras secundarias en el genoma (Drake 2007), y los mecanismos precisos de replicación viral (Chao y col. 2002; Sardanyes y col. 2012). Cabe destacar también, que los virus de RNA codifican sus propias polimerasas en sus genomas, mientras que algunos virus de DNA utilizan las polimerasas de sus hospedadores puesto que no codifican las suyas propias.

La tasa de mutación está relacionada de forma inversa con el tamaño genómico (figura 3), relación conocida como regla de Drake (Drake 1991). Aunque esta regla está muy bien documentada en organismos de DNA, en virus de RNA es necesario más esfuerzo para detectar una relación significativa (Sanjuán y col. 2010). Existen datos de tasas de mutación de virus de RNA de cadena sencilla (ssRNA), de RNA de doble cadena (dsRNA), retrovirus, ssDNA y dsDNA, medidas como sustituciones por nucleótido por célula infectada ($\mu_{s/n/c}$). Hasta ahora, la tasa de mutación viral descrita más elevada es la del bacteriófago Q β , un virus de ssRNA de polaridad positiva (+), con una tasa estimada de 1.1×10^{-3} s/n/c (Domingo y col. 1976), mientras que la más baja la presenta el bacteriófago T2, un virus de dsDNA con 9.8×10^{-8} s/n/c (Luria 1951; Drake 1991). De todos modos, aunque las diferencias entre virus de RNA y DNA parecen claras, algunas tasas de mutación de virus de RNA y DNA son similares. Por ejemplo, el virus $\Phi 6$ (dsRNA) presenta una tasa de 2.7×10^{-6} s/n/c (Chao y col. 2002), y el bacteriófago $\Phi X174$ (ssDNA), de 1.1×10^{-6} s/n/c (Raney y col. 2004; Cuevas y col. 2009a).

Se sabe que los virus con estadios de RNA evolucionan rápido, aunque recientes investigaciones muestran que la separación con los virus de DNA en términos evolutivos no está tan bien definida como se pensaba anteriormente, porque aunque en general las tasas de mutación de los virus de RNA son mayores que las de virus de DNA, las tasas de evolución en la naturaleza son a veces similares (Duffy y col. 2008; figura 4). Estudios filogenéticos proponen que muchos virus de ssDNA (Umemura y col. 2002; Shackelton y col. 2005; Duffy y col. 2008) y algunos de doble cadena (Firth y col. 2010), evolucionan a tasas cercanas o incluso similares a las de virus de RNA. Además, existen algunos ejemplos de virus de RNA con tasas anormalmente bajas, como es el caso del virus espumoso de los simios (SFV) y el virus linfotrópico humano de células T tipo II (HTLV-II), con 1.7×10^{-8} y 10^{-7} sustituciones/sitio/año respectivamente (Switzer y col. 2005; Lemey y col. 2005). Ambos casos son retrovirus, y aunque sus RTs no presentan mecanismos adicionales de corrección de errores, las bajas tasas se explican, en parte, por los

cómo diferencias en los tiempos de generación virales combinadas con la mutación, modelan la tasa de sustitución viral. Más controvertidos son los casos de otros virus de RNA con bajas tasas de evolución, aunque existen varios ejemplos, como los hantavirus y los flavovirus de roedores, que bien por co-divergencia con sus hospedadores, o por su modo de infección crónica, tienen tasas de 10^{-7} sustituciones/sitio/año (Charrel y col. 1999; Hughes y Friedman 2000; Plyusnin y Morzunov 2001). Como se ha comentado anteriormente, también hay ejemplos descritos de altas tasas de sustitución en virus de DNA, similares a las tasas de los virus de RNA. En el caso de los virus de ssDNA, aunque no codifiquen sus propias polimerasas y utilicen las de sus hospedadores (Flint y col. 2004), las altas tasas de recombinación que presentan pueden explicar, en parte, los altos niveles de diversidad génica intra-hospedador (Harrison y Robinson 1999; Hino y Miyata 2007).

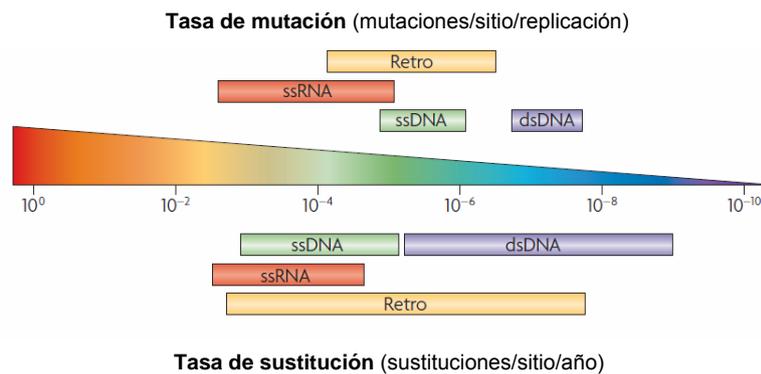


Figura 4. Comparación entre tasas de mutación y sustitución virales. Los rangos de tasas de mutación, presentados como mutaciones por sitio y por ronda de replicación, en la parte superior de la figura. Los rangos de tasas de sustitución, como sustituciones por sitio y por año, presentados en la parte inferior (adaptado de Duffy y col. 2008).

Algunos ejemplos son los parvovirus CPV-2 y B19, el virus de la panleucopenia felina (FPV), los circovirus y anelovirus SEN-V, y el geminivirus del rizado amarillo del tomate; que presentan tasas de 10^{-4} sustituciones/sitio/año, es decir, del orden de los virus de RNA (Shackelton y col. 2005; Shackelton y Holmes 2006; Duffy y Holmes 2008). Todas estas estimas se han llevado a cabo a partir de muestras obtenidas en la naturaleza. Análisis experimentales en condiciones de laboratorio podrían ayudarnos a determinar mejor los factores genético-evolutivos responsables de estas observaciones.

Debido al lastre genético que suponen las mutaciones deletéreas, los virus de RNA no pueden incrementar su tamaño genómico más allá de cierto umbral (Eigen y col. 1988). Así pues, por un lado las altas tasas de mutación confieren a los virus una gran capacidad adaptativa, pero por otro lado, existen constricciones debido al pequeño tamaño de sus genomas, como altos niveles de pleiotropía, compensaciones de eficacia, epistasia, y evolución convergente (Holmes 2003). La gran evolución paralela o convergente ha sido observada tanto en virus de RNA como de ssDNA a nivel molecular (Bull y col. 1997; Wichman y col. 1999; Crill y col. 2000; Cuevas y col. 2002; Rico y col. 2006; Agudelo-Romero y col. 2008; Domingo-Calap y col. 2010). En este aspecto parece que algunas de las propiedades de los genomas virales son debidas no a su material genético, si no al hecho de presentar pequeños genomas, por lo que virus de RNA y ssDNA pueden compartir características. La evolución experimental es una herramienta muy útil para poder comparar directamente estas propiedades en distintas especies virales.

Distribución de efectos mutacionales en virus

En virus de RNA los efectos mutacionales son marcados por la ausencia de funciones alternativas o reguladoras, modularidad, o redundancia genética (Holmes 2003; Elena

y col. 2006; Belshaw y col. 2008). Sin embargo, poco se conoce sobre las posibles diferencias entre virus de RNA y de DNA. Caracterizar los coeficientes de selección y su distribución en virus es experimentalmente sencillo, ya que es posible crear mutantes simples y determinar el efecto que supone en la eficacia una mutación puntual. Los virus de ssDNA tienen genomas de tamaño similar a los virus de RNA y puede esperarse que ambos tipos presenten una sensibilidad similar frente a las mutaciones, aunque existen diferencias obvias en términos evolutivos, genéticos y ecológicos. Por ejemplo, dado que las tasas de mutación de los virus de RNA son superiores, es posible que la selección actúe incrementando la robustez para así poder tolerar el gran número de mutaciones que se originan en los genomas (Schuster y Swetina 1988; Wilke y col. 2001; Sanjuán y col. 2007), aunque esto también debe promover la compresión genómica (Eigen y col. 1988; Holmes 2003; Belshaw y col. 2007). Además, el hecho de que los virus de RNA presenten sus propias replicasas y los virus de ssDNA utilicen las de sus hospedadores también puede repercutir en la robustez mutacional, ya que el gen de la replicasa va a representar una gran parte del genoma de los virus de RNA, y estos genes suelen presentar altos niveles de constricción. Por último, algunos virus de ssDNA codifican dos proteínas estructurales, lo que podría introducir cierto grado de redundancia en el proceso de ensamblaje de la cápside (Chen y col. 2007).

La rápida respuesta de los virus a fuertes presiones de selección, impuestas por ejemplo por antivirales o por el propio sistema inmunitario se explica en gran parte por las altas tasas de mutación, entre 10^{-4} y 10^{-6} sustituciones por ronda de replicación en el caso de los virus de RNA (Drake y Holland 1997; Domingo y Holland 1999; Holmes 2009). Algunos virus, sin embargo, no usan la mutación como mecanismo de evasión de la respuesta inmune, si no que se transmiten antes de que el sistema inmune pueda responder (Lucas y col. 2001). Además, hay otros factores implicados en la adaptabilidad, como el coeficiente de selección. Por ejemplo, se ha demostrado que organismos con baja robustez mutacional se adaptan más rápido (Cuevas y col. 2009b), aunque la relación entre robustez mutacional y la capacidad de evolucionar sigue aún en discusión. Fuertes efectos mutacionales implican que las mutaciones deletéreas son eliminadas de forma más eficiente, lo que favorece la

fijación de las mutaciones beneficiosas (Orr 2000). De hecho, la falta de mecanismos de robustez puede resultar en una mayor variación fenotípica que va a favorecer la selección de las mutaciones beneficiosas (Lenski y col. 2006; Frank 2007; Wagner 2008). Recordemos que el coeficiente de selección promedio de las mutaciones es una medida de la robustez genética. Una aproximación clásica para caracterizar este parámetro son los experimentos de acumulación de mutaciones, en los que líneas derivadas de un clon fundador son propagadas al menor tamaño poblacional posible para minimizar la selección y favorecer que las mutaciones se vayan acumulando (Mukai 1964; Keightley 2004). En este caso, se intenta obtener virus de muy baja eficacia, introduciendo una gran cantidad de mutaciones en los genomas. Generalmente, la forma de acumular mutaciones en virus son los llamados experimentos calva a calva (figura 5), y es posible acelerar el proceso utilizando agentes mutágenos durante los pases calva a calva. Una forma más directa y potente para medir los coeficientes de selección consiste en introducir en los genomas mediante ingeniería genética mutaciones al azar, aunque este sistema es mucho menos utilizado debido a su complejidad y dificultad para llevarlo a cabo en ciertos organismos (Eyre-Walker y Keightley 2007).

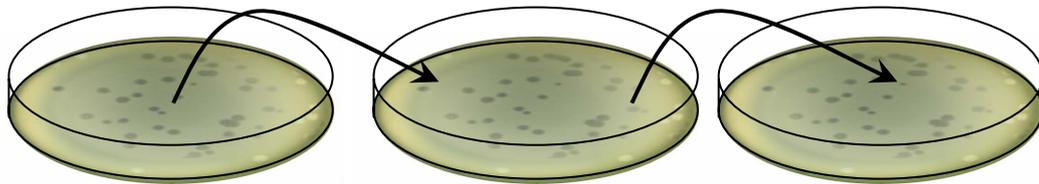


Figura 5. Pases seriados calva a calva. En este tipo de ensayos, los fuertes cuellos de botella llevan a una acumulación de mutaciones deletéreas en los genomas.

Sistema experimental:

bacteriófagos de RNA y DNA de cadena sencilla

Para poder resolver algunas de estas cuestiones evolutivas, como la relación entre tasa de mutación, robustez, adaptación y evolución molecular, hemos utilizado como modelo experimental los bacteriófagos, virus cuyos hospedadores son bacterias. Hemos escogido seis especies virales de tamaño genómico similar, tres de ssRNA (Q β , SP y MS2) y tres de ssDNA (Φ X174, G4 y f1), capaces de infectar todas ellas a la misma cepa de *Escherichia coli* (tabla 1). Todos los virus de ssRNA utilizados pertenecen a la familia *Leviviridae*, y presentan un genoma lineal de polaridad positiva, es decir, que su propia secuencia corresponde al mRNA, y puede ser traducido a proteínas directamente al entrar en la célula. Q β es un allovirus con un genoma de 4215 nucleótidos (nt) que codifica cuatro proteínas y un 73% de su genoma es codificante. Otro allovirus utilizado es SP, con 4276 nt y también 4 proteínas, y con un 85% de genoma codificante. El último virus de RNA utilizado es el levivirus MS2, el más pequeño de todos, con sólo 3569 nt que codifican 4 proteínas, y un 91% del genoma es codificante. La adsorción de todos estos virus es por el pilus F de la bacteria. En el caso de los virus de ssDNA, todos ellos presentan genomas circulares y replican mediante el método del círculo rodante. Φ X174 pertenece a la familia *Microviridae*, con un genoma de 5386 nt que codifica para 11 proteínas, y un 95% de secuencia codificante. Este virus fue el primer genoma de DNA secuenciado (Sanger y col. 1977). Otro microvirus relacionado es G4, con 5577 nt que codifican para 11 proteínas (87% del genoma codificante). Estos dos virus necesitan la ayuda del lipopolisacárido para penetrar en las bacterias. El último virus de ssDNA es f1, que pertenece a la familia *Inoviridae*, con 6407 nt, 10 proteínas (91% codificante), y cuya adsorción es también por el pilus F. La biología general de los seis virus se puede encontrar en libros de virología general (Calendar 2006). Se puede observar que todos los virus utilizados presentan genomas de pequeño tamaño y altamente codificantes, y todos excepto f1 que es filamentoso, son virus con cápsides icosaédricas.

Tabla 1. Resumen de las especies virales utilizadas.

Material genético	Familia	Género	Especie	Tamaño genómico	Número de genes	% Genoma codificante
ssDNA	<i>Microviridae</i>	Microvirus	ΦX174	5386	11	95
			G4	5577	11	87
	<i>Inoviridae</i>	Inovirus	f1	6407	10	91
ss(+)RNA	<i>Leviviridae</i>	Allolevivirus	Qβ	4215	4	73
			SP	4276	4	85
		Levivirus	MS2	3569	4	91

De los virus anteriores, sólo hay estimas de tasas de mutación para dos de ellos, Qβ y ΦX174, aunque la tasa descrita para el primero parece estar sobrestimada (Sanjuán y col. 2010). Puesto que para posteriores conclusiones es adecuado tener información lo más fiable posible sobre las tasas de mutación, las hemos estimado de nuevo en nuestro laboratorio. En este caso se han estimado mediante tests de fluctuación (Luria y Delbrück 1943; Luria 1951; Sanjuán y col. 2010) en las mismas condiciones de laboratorio que van a ser utilizadas en los experimentos de la presente tesis. En el caso de Qβ hemos obtenido un valor de $(4.0 \pm 1.0) \times 10^{-4}$ s/n/c (datos no publicados), lo que da una estima de 1.68 sustituciones por genoma por ronda de replicación, un valor inferior al estimado anteriormente de 1.1×10^{-3} s/n/c (Domingo y col. 1976). En el caso de ΦX174, el valor estimado es de 1.0×10^{-6} s/n/c, sin diferencias significativas con los valores estimados previamente (Raney y col. 2004; Cuevas y col. 2009a).

Como se ha comentado, todos los virus utilizados son capaces de infectar la misma especie bacteriana *Escherichia coli*. Las cepas que se han utilizado como hospedador son *E. coli* C IJ1862, proveniente del laboratorio del Prof. James J. Bull, y la cepa *E. coli* gro89 cedida por el Dr. Bentley A. Fane (Universidad de Arizona). Los virus utilizados también provienen del Prof. James J. Bull (Universidad de Tejas), excepto el clon infeccioso de Q β que fue cedido por el Dr. René C. Olsthoorn (Universidad de Leiden).

Objetivos

El objetivo central de la tesis es comparar las propiedades evolutivas de virus de ssRNA y ssDNA. Comprobaremos si los efectos mutacionales difieren entre estos dos tipos de virus, si los virus de RNA se adaptan más rápido que los de DNA, si las tasas de mutación virales son óptimas para la adaptación y qué ocurre cuando se aumenta artificialmente la tasa de mutación de los virus de ssRNA y ssDNA.

METODOLOGÍA

Pases seriados de evolución

Experimentos de adaptación

En cada infección, alrededor de 10^5 unidades formadoras de calvas de lisis (pfu) se inocularon en 0.5 mL de medio LB que contenía células *IJ1862* en fase exponencial. Para cada especie viral, dependiendo de la actividad lítica y de su tasa de crecimiento, se necesita una determinada densidad celular (por ejemplo, en los virus adaptados utilizamos una OD_{600} de 0.7 para $\Phi X174$ y G4, 0.15 para f1, Q β , y MS2, y 0.05 para SP; mientras que los virus no adaptados necesitan menor densidad). Una vez inoculados los tubos con los virus, los cultivos se incubaron en agitación (650 rpm) a 37C en un *Thermomixer 24-tube shaker* (Eppendorf) hasta que los virus llegaron a su fase tardía exponencial de crecimiento ($\sim 10^9$ pfu/mL). Una vez los virus alcanzaron el título deseado, las células se eliminaron por centrifugación y los sobrenadantes se alicuotaron, se guardaron a -80C, y se titularon usando medio LB solidificado con agar al 0.7%. Los títulos iniciales y finales se usaron para calcular la tasa de crecimiento en cada pase y ajustar el tiempo de recogida para el siguiente. Todos los experimentos de adaptación son ligeras modificaciones de este protocolo, ajustando las concentraciones virales y bacterianas, así como los tiempos de incubación, según necesidades.

Experimentos de acumulación de mutaciones

Para favorecer la acumulación de mutaciones deletéreas en virus, llevamos a cabo experimentos calva a calva, iniciados a partir de una población viral en medio líquido. Mediante un ensayo en placa usando medio LB solidificado con agar al 0.7%, se infectaron células *E. coli IJ1862* y se obtuvieron calvas de lisis, que se muestrearon (“picaron”) y se resuspendieron en 50 μ L de medio LB. Se guardaron alícuotas a -80C y una de ellas se utilizó para el siguiente pase, que de nuevo fue un ensayo en placa

para obtener nuevas calvas de lisis. Para incrementar la eficacia del método, entre pase y pase las calvas fueron sometidas a un agente mutagénico, el ácido nitroso (ver más adelante). El experimento se continuó hasta que el título en cada plaqueo cayó drásticamente, aproximándose a la extinción.

Determinación de la eficacia viral

Ensayos de crecimiento

Una aproximación para estimar la eficacia biológica de un virus es hacer ensayos para estimar tasas de crecimiento. En este tipo de experimentos, varios cultivos se inoculan al mismo tiempo, unos de ellos con los virus que se pretende testar, y otros cultivos con el virus *wild type* o “silvestre” (virus de referencia), que sirve como control del ensayo, y que se puede utilizar para corregir errores entre réplicas. Todas las líneas experimentales se ensayaron en el mismo bloque experimental y se realizaron al menos tres réplicas. Para ello, cultivos en líquido de células *IJ1862* (0.5mL de medio LB con células en fase exponencial) fueron inoculados con unas 10^4 pfu/mL. Los cultivos se incubaron en un *Thermomixer 24-tube shaker* (Eppendorf) a 37C a 650 rpm hasta que los virus *wild type* llegaron a un título estimado de unas 10^8 o 10^9 pfu/mL, dependiendo del ensayo. Las células se eliminaron por centrifugación y los sobrenadantes se guardaron a -80C y se titularon. La tasa de crecimiento (r) se calculó como el incremento en el logaritmo del título por hora. La eficacia relativa se obtuvo como $W = r_i / r_o$, donde i y o se refieren al mutante y al *wild type* respectivamente, y los efectos mutacionales (coeficiente de selección) se calcularon como $s = W - 1$.

Ensayos de competencia en Φ X174

Otra posibilidad más precisa para estimar la eficacia es hacer ensayos de competencia. En este caso, se inoculan cultivos en medio líquido con dos tipos diferentes de virus en proporciones conocidas. Uno es el virus problema del cual queremos conocer su tasa de crecimiento, y el otro un competidor común con algún marcador fenotípico o genético trazable. Este método resulta más preciso que el anterior (ensayo de crecimiento) puesto que estamos introduciendo un control interno a cada tubo de ensayo. Estrictamente hablando, en nuestros ensayos no hubo competencia puesto que el crecimiento fue siempre exponencial, pero usamos el término en un sentido laxo por tradición. Estos ensayos se hicieron únicamente con Φ X174 por ser el único virus para el cual teníamos un marcador fenotípico válido. Para llevar a cabo este tipo de experimentos, se inocularon 0.5 mL de LB que contenían células *IJ1862* con 10^4 pfu/mL de la población de virus de interés y con una concentración conocida de virus capaces de crecer en células *gro89* (competidor común). La cepa *gro89* sólo permite crecer a aquellos virus que presenten ciertas mutaciones bien definidas en la región N-terminal de la proteína A (Raney y col. 2004; Cuevas y col. 2011). Los cultivos se incubaron en un *Thermomixer 24-tube shaker* (Eppendorf) a 37C a 650 rpm hasta que los virus de interés alcanzaron un título estimado de unas 10^8 pfu/mL. Las células se eliminaron por centrifugación y los sobrenadantes se guardaron a -80C. La titulación se realizó tanto en *IJ1862* como en *gro89*, usando en ambos casos CaCl_2 para incrementar la eficiencia del ensayo en placa. En *IJ1862* crecen todos los virus, es decir, nuestros virus de interés así como los competidores comunes, mientras que la cepa *gro89* presenta una mutación en el gen *rep* (helicasa), que bloquea el estadio III de la síntesis de DNA de simple cadena, lo que impide la maduración del virus *wild-type* (Tessman y Peterson 1976; Ekechukwu y col. 1995) y sólo aquellos virus que presenten ciertas mutaciones podrán crecer en este tipo celular. Las sustituciones descritas que confieren la capacidad de completar el ciclo viral se encuentran todas en la proteína A de Φ X174, y son: leucina en la posición 77; treonina, prolina o valina en la posición 80; y alanina, glicina o valina en la posición 82 (Cuevas y col. 2009). La tasa de crecimiento se

calculó como el cambio del título por hora en escala logarítmica para cada virus ensayado (r) y para el competidor común (r_c). La eficacia relativa de los competidores es $w = r / r_c$ y la eficacia de cada fago relativa al clon fundador se calculó como $W = w / w_0$, donde el subíndice 0 indica el clon fundador.

Estimas de frecuencias de mutación

Para determinar frecuencias de mutación, una posibilidad es dejar crecer a los bacteriófagos en un medio u hospedador permisivo, y posteriormente realizar un ensayo en placa en un medio selectivo en el que sólo aquellos virus con determinadas mutaciones puedan crecer. En este caso, hemos obtenido frecuencias de mutación para $\Phi X174$, y como hospedador selectivo de nuevo hemos utilizado la cepa *gro89*, en la que sólo aquellos virus que presenten determinadas mutaciones que les permitan crecer en las condiciones restrictivas podrán replicar y formar calvas de lisis visibles. Para llevar a cabo este tipo de experimentos, los virus se crecieron en células *IJ1862*, y posteriormente, se plaquearon en medio LB solidificado con agar al 0.7% tanto en *IJ1862* como en *gro89*. Se obtuvo así la relación entre el título viral en el hospedador selectivo y el título total obtenido en el hospedador permisivo, lo cual permite obtener la frecuencia de mutación observada, aunque es importante remarcar que en este tipo de ensayos nos fijamos en una región muy pequeña del genoma, unos pocos nucleótidos.

Mutagénesis química

Ácido nitroso

El ácido nitroso convierte aminas en diazos, y en el contexto celular, provoca la desaminación oxidativa de la adenina y la citosina, originando transiciones. Actúa esencialmente sobre los ácidos nucleicos de simple cadena (Horn y Herriott 1962). La metodología para utilizar este ácido como agente mutágeno fue mezclar cuatro volúmenes de tampón acetato 0.3 M pH 4.3 con un volumen de nitrito sódico 5 M. Posteriormente, se añadieron 50 μL de esta solución inmediatamente a 4 μL de virus en LB, obtenidos a partir de calvas de lisis. El tiempo de exposición se ajustó para tener la máxima pérdida de título que garantizara poder picar calvas posteriormente (unas 100 pfu totales tras la exposición). Este método se usó durante los pases calva a calva para incrementar el número de mutaciones introducidas por genoma en el menor tiempo posible. Tras picar las calvas y someterlas a mutagénesis, la reacción se paró con 100 μL de tampón acetato 1 M pH 7.0 suplementado con BSA 0.1 mg/mL. A continuación se realizó un ensayo en placa, se picaron calvas de lisis, se resuspendieron en 50 μL , se hicieron alícuotas, y se guardaron a -80C . Posteriormente se utilizaron para una siguiente ronda de mutagénesis química.

5-Fluorouracilo

Otro agente mutagénico que puede ser utilizado es el 5-fluorouracilo (5-FU). Esta sustancia es un análogo de pirimidina que se usa en el tratamiento contra el cáncer y pertenece a la familia de las drogas llamadas antimetabolitos. Es un inhibidor suicida que inhibe de forma irreversible a la timidilato sintasa, por lo que bloquea la síntesis de timidina y por tanto la síntesis de DNA, aunque también afecta a otros procesos como la transcripción o la traducción. En este caso, se añadió 5-FU al cultivo en el que se creció el virus en para incrementar la tasa de mutación viral.

Mutagénesis dirigida

Obtención de mutantes

La mutagénesis dirigida permite introducir una mutación en un sitio nucleotídico determinado. Para ello, es necesario partir de DNA circular del bacteriófago de interés, ya sea el propio genoma o si se desea mutagenizar un virus de RNA, un clon infeccioso de cDNA en un plásmido. Para obtener el DNA molde a mutagenizar, utilizamos el kit *High Pure Plasmid Isolation* (Roche) o similar, que sirvió tanto para purificar el plásmido del clon infeccioso en el caso del fago Q β , como las formas replicativas de dsDNA en el caso del fago Φ X174.

Obtuvimos amplicones de PCR del DNA circular completo a partir de 500pg de molde usando la DNA polimerasa *Phusion high-fidelity* (New England Biolabs), que presenta una tasa de error de 4.4×10^{-7} errores por base por ronda de replicación según el proveedor. El método se basa en el uso de un par de cebadores adyacentes y divergentes, fosforilados en la posición 5' con *T4 polynucleotide kinase* (Fermentas), uno de los cuales lleva la sustitución nucleotídica que deseamos introducir. Las condiciones de PCR utilizadas fueron 98C 2min, 30 ciclos de 98C 10s, 68C 30s, 72C 3min, y una extensión final de 72C 5min para Φ X174; y 98C 2min, 30 ciclos de 98C 30s, 68C 30s, 72C 5min, y una extensión final de 72C 5min para Q β . Los productos de PCR se circularizaron posteriormente usando la *Quick T4 ligase* (New England Biolabs) y transfectamos células competentes *IJ1862* por choque térmico (42C, 30s), en presencia de CaCl₂ 100 mM. Las células transfectadas se transfirieron inmediatamente a placas de LB usando agar al 0.7% y fueron incubadas a 37C. Una vez las calvas de lisis fueron visibles se picaron, se resuspendieron en 50 μ L de LB y se guardaron a -80C (figura 6). Para verificar que la mutación deseada estaba introducida y que no se habían introducido cambios adicionales durante el proceso de amplificación en la región flanqueante, se llevó a cabo una (RT)-PCR directamente de la calva resuspendida en LB. Para la síntesis de cDNA se utilizó la RT *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase* (Fermentas) y para la PCR la polimerasa *Phusion* anteriormente mencionada. Las condiciones para la retrotranscripción fueron

42C 2min, 20C 5min, 25C 5min, 30C 5m, 35C 5min, 37C 5min, 42C 45min y 94C 2min. En el caso de las PCR, las condiciones fueron 98C 2min, 30 ciclos de 98C 10s, 68C 30s, 72C 1min, y una extensión final de 72C 5min para Φ X174, mientras que para Q β el programa fue 98C 2min, 30 ciclos de 98C 10s, 65C 30s, 72C 1min, y una extensión final de 72C 5min. Los productos de PCR se purificaron mediante columnas de purificación con *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research) y se secuenciaron utilizando cebadores específicos.

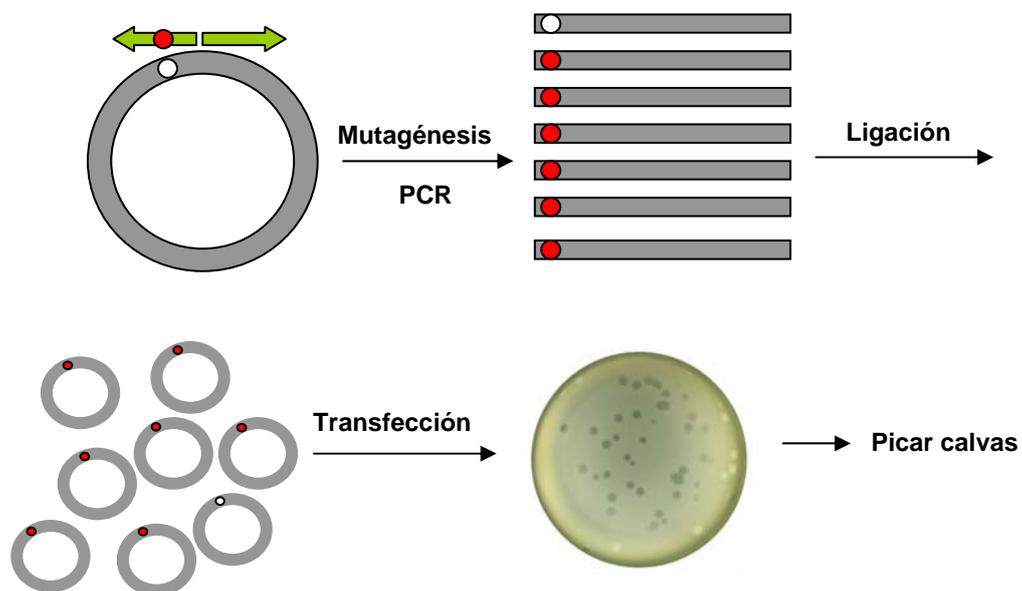


Figura 6. Proceso de mutagénesis dirigida. Se utiliza un par de cebadores adyacentes divergentes, uno de los cuales contiene la mutación que queremos introducir. Tras la PCR, la mayor parte de los amplicones tendrán la mutación deseada. Una vez ligamos los productos, se transfectan por choque térmico en células competentes y se pican las calvas.

Demostración del efecto letal de una mutación

En los casos donde tras la transfección no se observaban calvas de lisis, o en el caso de obtener virus y tras secuenciar la región de interés éstos no poseían la mutación deseada, el protocolo completo se repitió; y tras tres réplicas fallidas, se clasificaron como candidatos a mutantes letales. Para confirmar la letalidad, se diseñaron cebadores nuevos, idénticos a los utilizados en la reacción de mutagénesis, pero que no portaban la mutación que queríamos introducir. A continuación, se llevaron a cabo todos los pasos exactamente como anteriormente y se utilizó la PCR con estos cebadores como control del proceso. La letalidad en este caso se demostró comparando el número de calvas obtenidas en las mutagénesis donde se introduce la mutación en relación a las mutagénesis control.

Determinación de la fiabilidad de la técnica

Para determinar el error experimental y, en particular, controlar las mutaciones potenciales presentes en los moldes de DNA, introducidas durante la amplificación por PCR, o durante el crecimiento de las calvas de lisis, ensayos similares se llevaron a cabo. Para cada virus, se transfectaron tres mutagénesis control como las previamente descritas (es decir, obtenidas a partir de cebadores que no llevan mutación alguna), y se picaron 12 calvas de lisis de forma aleatoria. Se midió la eficacia relativa de cada clon y se calculó la media y la varianza de la eficacia. Estos valores fueron sustraídos de las medias y las varianzas obtenidas para los mutantes reales.

Análisis de secuencias

Los productos obtenidos por PCR o RT-PCR a partir de los sobrenadantes virales fueron purificados mediante columnas (*Zymoclean Gel DNA Recovery Kit*, Zymo Research), y los genomas completos fueron secuenciados mediante el método de Sanger. En los casos en los que las lecturas eran de baja calidad, los fragmentos de PCR se clonaron utilizando el *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit* (Invitrogen) y los insertos se secuenciaron con cebadores internos y externos del vector. Las secuencias se obtuvieron a partir de los cromatogramas utilizando el programa *Staden* (<http://staden.sourceforge.net>). El análisis de secuencias, incluyendo d_S (sustituciones sinónimas por sitio sinónimo) y d_N (sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo), se obtuvo utilizando los programas *MEGA* (<http://www.megasoftware.net>) y *GeneDoc* (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>).

RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

Adaptación preliminar

Para poder comparar las propiedades evolutivas de los virus de ssRNA y ssDNA es necesario trabajar con virus que, por lo demás, tengan características similares. Algunas propiedades que han de compartir son el tamaño genómico, la capacidad de infectar el mismo hospedador y la posibilidad de adaptación a las mismas condiciones de laboratorio. De este modo, podremos afirmar con mayor seguridad que las posibles diferencias entre virus de ssRNA y de ssDNA son debidas a su diferente material genético y no a otros factores. Hemos elegido como especies modelo tres bacteriófagos de ssRNA (Q β , SP y MS2) y tres de ssDNA (Φ X174, G4 y f1).

En primer lugar realizamos un experimento de adaptación preliminar (con una única línea por cada especie viral) a la cepa *E. coli* C IJ1862, creciendo los virus en medio LB a 37C y 650 rpm. Los pases de evolución se llevaron a cabo a altos tamaños poblacionales (inóculo inicial de cada pase de 10^5 pfu) para favorecer así la adaptación. Realizamos alrededor de 90 pases por cada especie viral, suficientes para llegar a valores estables de eficacia. Puesto que la eficacia se mantuvo estable alrededor de un valor máximo, asumimos que los virus se encuentran cerca de un pico de alta eficacia de acuerdo con el concepto de paisaje adaptativo. Estos valores de eficacia fueron los de referencia para cada virus (tabla 2).

A la vista de los resultados, podemos ver que cada especie viral presenta su propia tasa máxima de crecimiento. Por ello, a la hora de hacer posteriores comparaciones, la eficacia la vamos a expresar siempre relativa al correspondiente valor de referencia. También se observa que, lógicamente, los tiempos de incubación una vez los virus han sido adaptados varían entre especies.

Tabla 2. Tasa de crecimiento y tiempos de incubación de los virus adaptados a la cepa *E. coli* C cepa JJ1862 y usados como referencia para posteriores experimentos

Material genético	Especie	Tasa de crecimiento por hora (<i>r</i>)	Tiempo de incubación ^a
ssDNA	ΦX174	9.78	55 min
	G4	7.37	1 h 10 min
	f1	4.07	2 h 05 min
ss(+)RNA	Qβ	4.68	1 h 50 min
	SP	2.64	2h 40 min
	MS2	6.03	1 h 35 min

^a Tiempo necesario para incrementar el tamaño poblacional de 10^5 a 10^9 pfu/mL.

Acumulación de mutaciones

A partir de los virus de alta eficacia que obtuvimos en el experimento preliminar de las seis especies virales (ΦX174, G, f1, Qβ, SP, y MS2,) se muestrearon tres calvas por cada especie y se usaron para iniciar linajes independientes de acumulación de mutaciones. Los sobrenadantes de los virus obtenidos a partir de las calvas de lisis se sometieron a mutagénesis química con ácido nitroso, posteriormente se ensayaron en placa para aislar nuevas calvas de lisis, y se repitieron los pasos realizando pases calva a calva en presencia de mutágeno para incrementar el número de mutaciones introducidas por unidad de tiempo. El ácido nitroso es un agente mutágeno que va a incrementar el número de mutaciones introducidas en cada pase, por lo que el tiempo necesario para llegar a disminuir la eficacia viral de forma drástica será menor. Bajo estas condiciones de crecimiento, en las que los cuellos de botella generados hacen que la deriva genética prevalezca sobre la selección (excepto para mutaciones altamente deletéreas o letales), teóricamente la presión mutacional y la deriva van a

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos en el experimento de acumulación de mutaciones.

Material genético	Especie ^a	Número de pases	Eficacia relativa	Número de mutaciones	Efecto en la eficacia por mutación ^b
ssDNA	ΦX174	60.3 ± 3.0	0.235 ± 0.004	16.0 ± 3.0	-0.051 ± 0.008
	G4	34.0 ± 11.7	0.313 ± 0.103	10.7 ± 2.9	-0.072 ± 0.169
	f1	45.7 ± 9.9	0.342 ± 0.121	25.7 ± 2.8	-0.027 ± 0.007
	Media	46.7 ± 5.9	0.297 ± 0.049	17.4 ± 2.6	-0.050 ± 0.015
ss(+)RNA	Qβ	14.3 ± 3.7	0.295 ± 0.053	18.7 ± 2.4	-0.040 ± 0.008
	SP	7.0 ± 2.1	0.205 ± 0.089	15.0 ± 2.3	-0.057 ± 0.014
	MS2	7.3 ± 0.3	0.313 ± 0.081	15.0 ± 1.0	-0.046 ± 0.003
	Media	9.6 ± 1.7	0.284 ± 0.031	16.2 ± 1.2	-0.047 ± 0.009

^a Para cada virus, se presenta la media de los tres linajes independientes ± SEM.

^b Calculado sustrayendo uno de la eficacia relativa y dividiendo por el número de mutaciones.

ser las únicas fuerzas evolutivas que van a conducir hacia la fijación de las mutaciones. Los pases se continuaron hasta que la pérdida de eficacia fue significativa en cada uno de los linajes. Además, el número de pases necesario para disminuir la eficacia fue diferente para cada especie. Una vez obtenidos los linajes de baja eficacia, en los que se espera que el número de mutaciones acumulado sea alto, se llevaron a cabo ensayos de crecimiento para obtener valores de eficacia. La eficacia se calculó como cociente entre el valor obtenido en el ensayo de crecimiento y el valor para el virus de referencia (eficacia relativa; tabla 3 y figura 7). Los virus de ssRNA alcanzaron una eficacia relativa media de 0.284 ± 0.031 , y los de ssDNA 0.297 ± 0.049 . Para evaluar estadísticamente las diferencias entre estos dos grupos,

usamos un modelo lineal univariante con dos factores: material genético (M, factor fijo principal), y especie viral (E, factor aleatorio encajado dentro de M), mientras que los linajes son las réplicas experimentales. De acuerdo con este modelo, el cambio en la eficacia es homogéneo entre las seis especies (ANOVA encajado: $P = 0.769$) y no detectamos diferencias entre los virus de ssRNA y ssDNA (ANOVA encajado: $P = 0.605$). Por tanto, todas las especies sufrieron pérdidas de eficacia similares. El número de pases necesario para llegar a una misma pérdida de eficacia es mucho mayor en los virus de ssDNA (47 ± 6) que en los de ssRNA (10 ± 2 ; ANOVA encajado: $P = 0.010$). Esto puede ser debido, en parte, a la menor tasa de mutación espontánea de los virus de ssDNA, o también a una menor susceptibilidad al mutágeno.

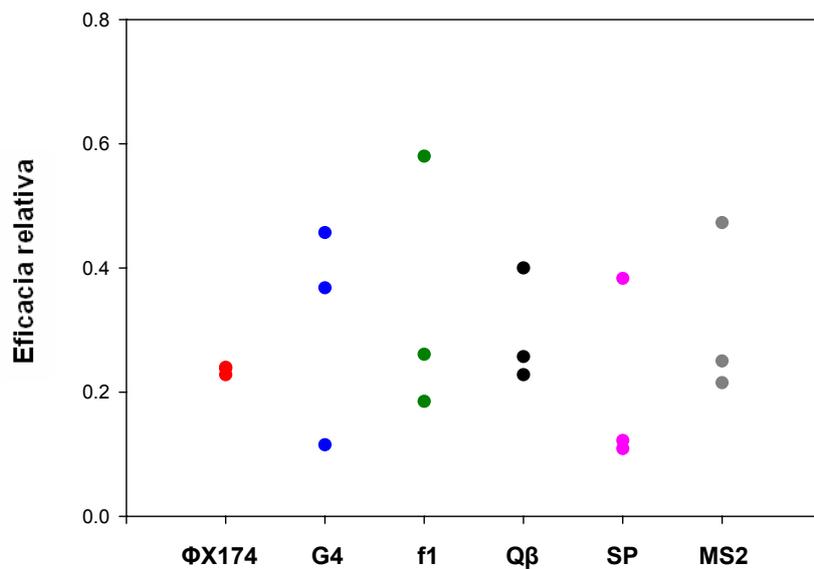


Figura 7. Eficacia relativa de los linajes de los virus Φ X174, G4, f1, Q β , SP y MS2 tras los pases de acumulación de mutaciones calva a calva.

Para determinar las bases moleculares del proceso de pérdida de eficacia, secuenciamos los seis linajes ancestrales adaptados de alta eficacia y los pases finales de los 18 linajes evolucionados tras la acumulación de mutaciones de baja eficacia (números de acceso de GenBank GQ153912- GQ153935; figura 8, tabla suplementaria 1). No detectamos ninguna zona caliente (hot spot) en el genoma de ninguna especie que acumule un mayor número de mutaciones, ni observamos agrupación de éstas por genes. Los virus de ssRNA y ssDNA acumularon de media 16 ± 1 y 17 ± 3 sustituciones nucleotídicas respectivamente (ANOVA encajado: $P = 0.802$). Para calcular el efecto promedio por mutación, dividimos la pérdida de eficacia para cada linaje por el número de mutaciones acumulado, y de nuevo no detectamos diferencias entre ssRNA (-0.047 ± 0.009) y ssDNA (-0.050 ± 0.015 ; ANOVA encajado: $P = 0.870$; tabla 3). Podemos decir por tanto que la robustez mutacional es similar en los virus de ssRNA y ssDNA evaluados. Únicamente f1 parece ser ligeramente más robusto que el resto de virus utilizados, puesto que parece acumular un mayor número de mutaciones para una misma pérdida de eficacia, aunque tras llevar a cabo un test post-hoc de Tukey para intentar determinar agrupaciones, las seis especies forman un único grupo coherente al nivel de significación del 5%. En ambos grupos, la proporción de transiciones fue alta, aunque más marcada en los virus de ssDNA (94.9 % frente al 84.9%, test de Fisher: $P = 0.004$). Como el ácido nitroso induce la formación de transiciones, esto sugiere que en el caso de los virus de ssDNA la mayor parte de las mutaciones fueron debidas a la acción del mutágeno, mientras que en el caso de los virus de ssRNA la contribución de las mutaciones espontáneas fue superior. De hecho, hay que recordar que el número de pases necesarios para disminuir la eficacia fue 5 veces superior en el caso de los virus de ssDNA, por lo que la exposición al ácido nitroso fue mayor. Cabe destacar que la elevada cantidad de transiciones frente a transversiones en los virus de DNA no resulta en una mayor fracción de sustituciones sinónimas (ANOVA encajado: $P = 0.484$) y que por tanto, las estimas de la acción de la selección no se ven sesgadas.

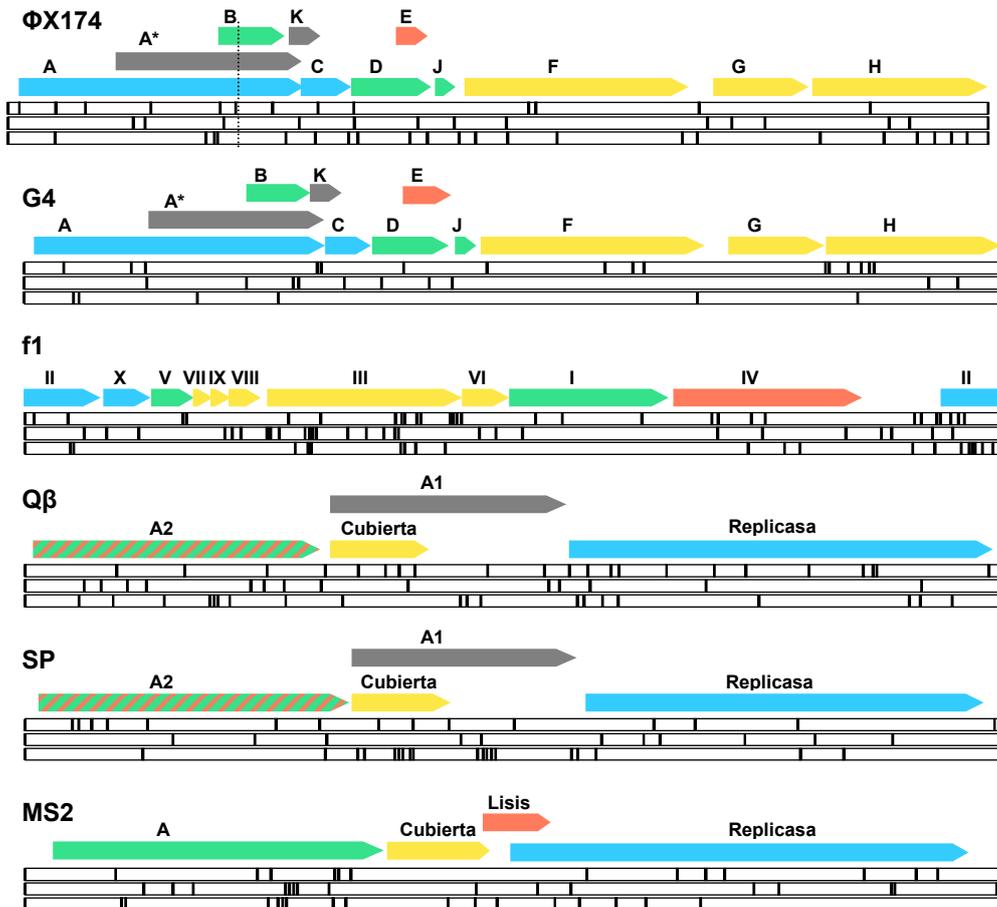


Figura 8. Estructura genómica de los virus Φ X174, G4, f1 Q β , SP y MS2 y localización de las sustituciones nucleotídicas fijadas en los linajes de acumulación de mutaciones. Las flechas indican la localización de cada cistron y los colores representan la categoría funcional (azul: replicación, verde: ensamblaje, amarillo: cubierta, rojo: lisis/extrusión, gris: otra/desconocida). Algunos genes son multifuncionales (varios colores). La localización de cada mutación fijada en el experimento de acumulación de mutaciones está marcada como barras negras dentro de los rectángulos blancos, donde cada rectángulo representa un linaje viral independiente. Los tres virus de DNA tienen el genoma circular pero se ha representado de forma lineal por conveniencia. Los genomas de Φ X174 y G4 están presentados colinealmente para indicar su homología. Por convención, la primera posición del genoma de Φ X174 se asigna al único sitio Pst I (línea vertical punteada).

A la vista de los resultados, podemos concluir que no hay diferencias significativas en robustez entre virus de ssRNA y ssDNA. Como se ha comentado, el virus que parece ser capaz de tolerar más mutaciones es f1, aunque las diferencias no son significativas. Una posible explicación sería que f1 es un virus con una cápside filamentosa y pocos genes solapados, en contra del resto de los virus que presentan cápsides icosaédricas y un mayor porcentaje de zonas solapantes, lo cuál hace pensar que, o bien su menor grado de constricción estructural, o su menor compactación genómica (ambas características van ligadas puesto que el genoma tiene menos restricciones espaciales a la hora de ser empaquetado en una cápside filamentosa) le conferiría cierta robustez frente a la mutación. De hecho, f1 fue el primer sistema utilizado como vector de clonación, lo cuál demuestra su poca restricción espacial (Moir y col. 1982; Barany y Boeke 1983). Aún así, sería necesario realizar estudios más exhaustivos para poder llegar a una conclusión, puesto que con los resultados obtenidos en este experimento no podemos afirmar que f1 sea más robusto que el resto de los virus ensayados. En experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, utilizando las mismas condiciones experimentales que en la presente tesis, se han construido 100 mutantes simples por mutagénesis dirigida de este virus, y se ha visto que una quinta parte de las mutaciones al azar son letales. Además, las mutaciones viables reducen la eficacia una media de un 11%, y las mutaciones en zonas no codificantes tienen un efecto mayor (una media del 14%), con lo que se confirma una elevada sensibilidad mutacional (Peris y col. 2010).

Un aspecto importante a remarcar en los experimentos de acumulación de mutaciones es que, aunque resultan interesantes para obtener los efectos mutacionales promedio, quedan lejos de poder ser útiles para determinar de forma precisa la distribución estadística de los mismos. Además, en este tipo de ensayos, todas aquellas mutaciones que sean letales no van a poder ser detectadas, ya que no permiten la formación de calvas de lisis y no van a ser muestreadas. Además, en los pases calva a calva, donde se pretende que la deriva genética predomine y sea la fuerza motriz que permita la fijación de las mutaciones, los tamaños poblacionales en las calvas de lisis son superiores a uno, por lo que un pequeño grado de selección es inevitable. Esto implica que no solamente las mutaciones letales sino todas

aquellas que sean fuertemente deletéreas van a escapar a la detección. Como consecuencia, estos experimentos subestiman la intensidad de la selección.

Recuperación de eficacia

A partir del experimento anterior de acumulación de mutaciones, hemos utilizado los tres clones finales de baja eficacia de cada una de las seis especies (Φ X174, G4, f1, Q β , SP, y MS2,) para llevar a cabo 50 pases seriados de evolución a altos tamaños poblacionales en un ambiente constante (el mismo que en el experimento preliminar) con el fin de recuperar la eficacia de las poblaciones, determinar las bases moleculares del proceso, y detectar posibles diferencias entre virus de ssRNA y ssDNA. Como los virus se han adaptado a las mismas condiciones que las descritas en la fase preliminar, conocemos su eficacia máxima. Los virus de partida presentan una elevada cantidad de mutaciones acumuladas, por lo que esperamos observar reversiones o mutaciones compensatorias. Si se dan mutaciones compensatorias, cabe la posibilidad de que las poblaciones no lleguen a los mismos picos adaptativos que los determinados en la fase preliminar. Las estimas de tasas de crecimiento tras cada pase usando los títulos iniciales y finales nos permiten obtener una visión global del proceso de recuperación de eficacia (figura 9). Tras los 50 pases, la mayoría de los linajes llegaron a recuperar su eficacia ($W = 1$) fluctuando alrededor de ese valor. Además, ninguno de ellos superó el valor de eficacia máxima obtenido en el experimento preliminar de adaptación, sugiriendo que, o bien existe un único pico adaptativo, o bien existen varios pero con un valor similar de eficacia.

A la vista de la figura 9, un patrón general entre los virus de ssRNA es que la eficacia incrementa rápidamente durante los primeros pases y luego oscila entorno valores cercanos a la máxima eficacia. Este patrón es compartido por algunos linajes de los virus de ssDNA, pero el incremento inicial se encuentra desplazado en el tiempo. En ciertos casos, como en un linaje de Φ X174 y otro de G4, la eficacia sigue siendo muy

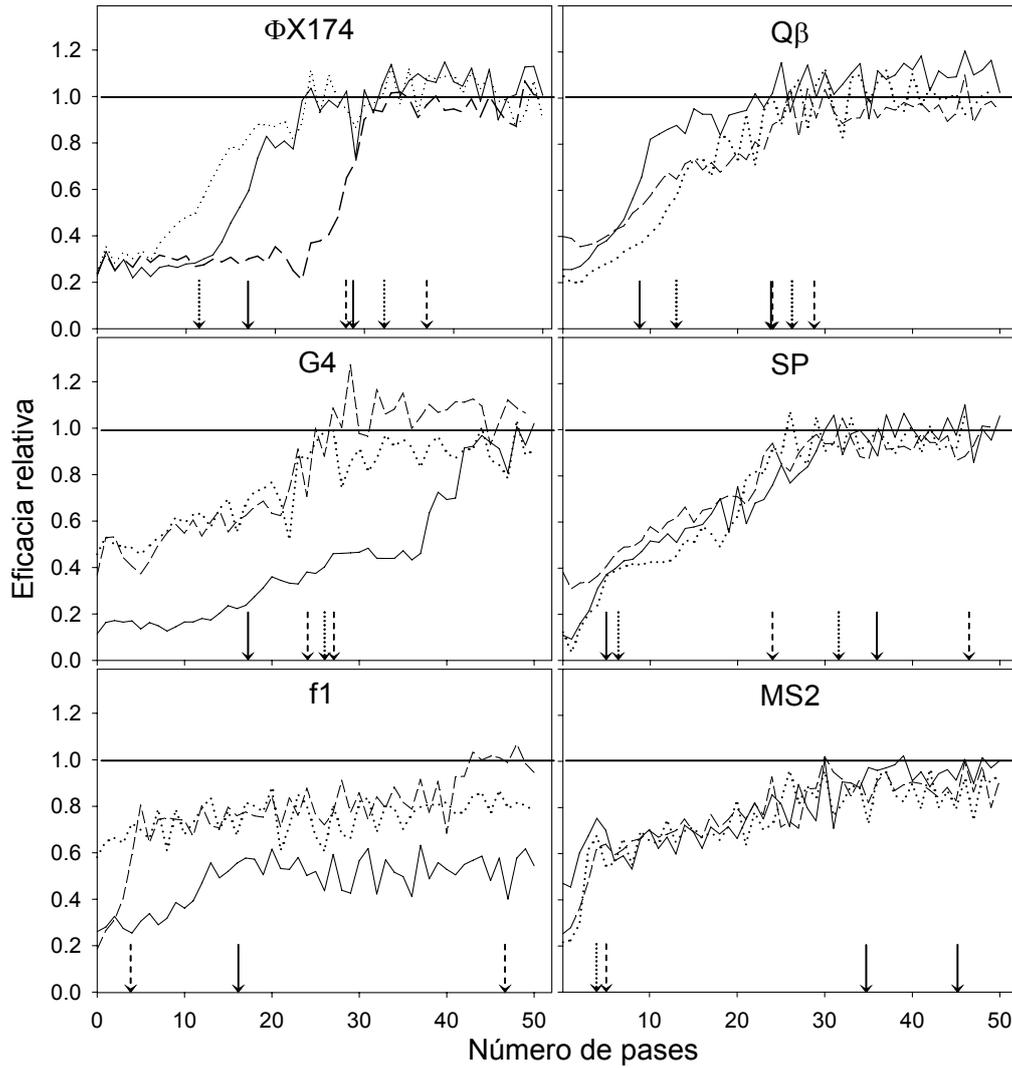


Figura 9. Trayectoria adaptativa de los linajes de las seis especies virales. La eficacia relativa al virus de referencia adaptado en cada caso se muestra representado con una línea discontinua ($W = 1$). Las curvas continuas, discontinuas y punteadas representan los linajes 1, 2 y 3 respectivamente. Las flechas verticales indican dos marcas: $W = 2 W_0$ (donde W_0 es la eficacia relativa del clon fundador), y $W = 1$. Para reducir el error, hemos considerado indicar la marca cuando al menos tres valores puntuales superan el valor. En algunos casos, esto no ocurre tras los 50 pases y no se muestra la flecha.

baja tras 20 pases de evolución aunque luego aumenta. Por el contrario, los linajes 1 y 2 de f1 no parecen llegar a adaptarse tras los 50 pases del experimento. Una forma de cuantificar la tasa de adaptación es calcular el número de pases necesarios para que cada linaje doble su eficacia inicial ($W = 2W_0$), o bien puede calcularse el número de pases para llegar a adaptarse ($W = 1$). En el primer caso, el número mediano de pases requerido para doblar la eficacia inicial es de 10 para los virus de RNA y de 18 pases para los de DNA. En el caso de alcanzar la eficacia máxima, son necesarios 37 pases para los virus de ssRNA y 48 para los de ssDNA. Por tanto, los virus de ssRNA se adaptan entre 1.3 y 1.8 veces más rápido que los de ssDNA durante el experimento realizado. Cabe destacar que aquellos linajes cuya eficacia inicial es más elevada requieren un mayor número de pases para llegar a doblar su eficacia (correlación de Spearman: $\rho = 0.718$, $P = 0.001$, figura 10), tal y como se espera por su menor distancia al óptimo, ya que el incremento de eficacia que le pueden aportar las mutaciones beneficiosas es menor. La mayoría de los linajes evolucionados presentan una progresiva deceleración en la tasa de adaptación, y este hecho ya ha sido descrito previamente en virus y otros microorganismos (Elena y Lenski 2003).

Seguidamente realizamos ensayos de crecimiento en los que se compararon directamente los linajes del pase 50 con el virus de referencia. Los resultados no muestran diferencias significativas entre los virus obtenidos tras la evolución y el virus de referencia, confirmando que se ha completado la recuperación de eficacia ($W = 1$), aunque existen tres excepciones: el linaje 1 del virus G4 (t-test: $P = 0.046$) y los linajes 1 ($P = 0.005$) y 2 ($P = 0.015$) de f1. Puesto que los virus de ssDNA utilizados presentan tasas de mutación muy similares, la ineficiencia de f1 frente a $\Phi X174$ y G4 es inesperada. Si nos fijamos en el número de mutaciones acumulado tras el experimento anterior de acumulación de mutaciones (tabla 3) vemos que, aunque no se detectan diferencias significativas, el número de mutaciones es mayor y, el efecto medio por mutación es algo menor en f1. Esto implica que al iniciar la recuperación de eficacia, un mayor número de mutaciones han de ser compensadas, y además, se espera que cada una de las mutaciones compensatorias o reversiones sean seleccionadas de forma menos intensa.

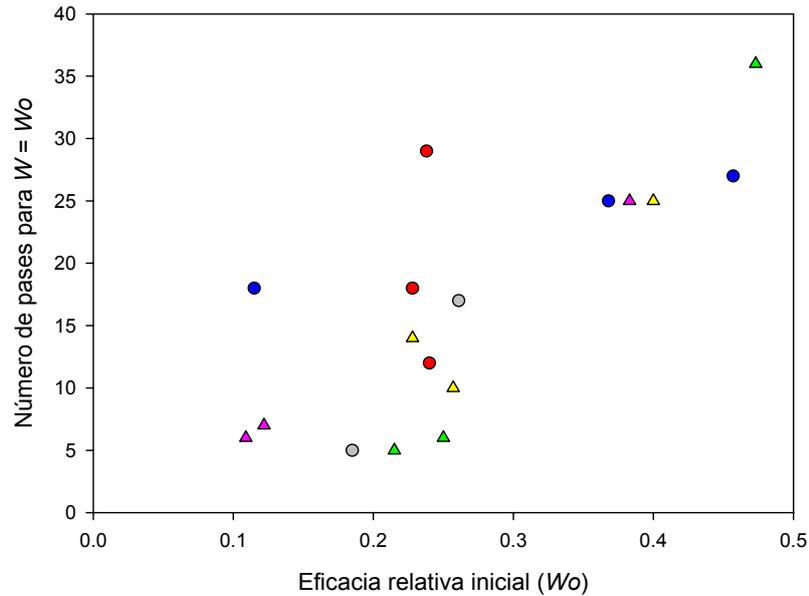


Figura 10. Correlación entre la eficacia inicial (W_0) y el número de pases necesario para duplicar la eficacia inicial ($W = 2W_0$). Los círculos representan los virus de ssDNA (rojo: $\Phi X174$; azul: G4; gris: f1), y los triángulos los virus de ssRNA (amarillo: Q β ; rosa: SP; verde, MS2).

Para cuantificar la adaptación en función del tiempo, calculamos la diferencia entre la eficacia a un tiempo dado y la eficacia del clon fundador dividida por el número de pases. Esto mostró que, a corto plazo, los virus de ssRNA tienden a adaptarse más rápido que los de ssDNA. Estas diferencias disminuyen gradualmente con el número de pases (figura 11). Por ejemplo, tras los cinco primeros pases, el incremento en la eficacia media por pase fue de 0.042 ± 0.008 en los virus de ssRNA y 0.010 ± 0.008 en los de ssDNA (test de Mann Whitney: $P = 0.006$); mientras que en el pase 25, estos valores fueron de 0.025 ± 0.003 y 0.017 ± 0.004 respectivamente (test de Mann Whitney: $P = 0.190$). Por tanto, podemos concluir que los virus de ssRNA se adaptan significativamente más rápido que los de ssDNA a corto plazo. La interpretación más

sencilla de este fenómeno es que, conforme la población se acerca a su óptimo adaptativo, el número de mutaciones beneficiosas disponibles o su efecto disminuyen. El hecho de que los virus de ssRNA presenten una adaptabilidad superior en los primeros pases es explicado, en parte, por sus elevadas tasas de mutación. Sin embargo, conforme las poblaciones se aproximan al pico adaptativo, la ventaja de tener una mayor tasa de mutación es menos acusada y, por otro lado, tasas de mutación elevadas pueden incrementar la carga genética y dificultar la adaptación.

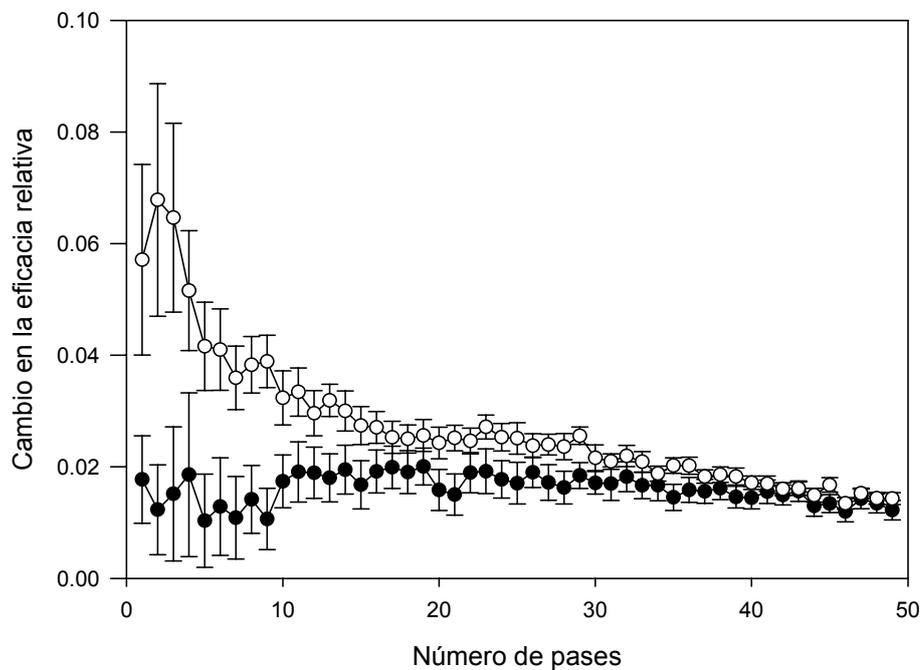


Figura 11. Tasa de adaptación acumulada en virus de RNA (círculos blancos) y DNA (círculos negros) para cada pase. La tasa se ha calculado como la diferencia en la eficacia relativa con el clon fundador dividido por el número de pases. Las barras de error indican el error estándar de la media.

Para comparar a nivel molecular el proceso evolutivo en virus de ssRNA y ssDNA, secuenciamos todos los genomas de los linajes evolucionados del pase 50 (números de acceso de GenBank JF719726 - JF719743, figura 12, tabla suplementaria 2). Como se ha comentado, la adaptación se inició con clones de los linajes de acumulación de mutaciones del experimento anterior, por lo que podemos determinar los cambios genéticos acontecidos durante el proceso de recuperación de eficacia en cada linaje. Los virus de ssRNA acumularon una media de 15 ± 1 sustituciones nucleotídicas por genoma durante los 50 pases, mientras que los virus de ssDNA acumularon 4 ± 1 mutaciones (test de Mann Whitney: $P < 0.001$). El patrón de sustituciones aparece cualitativamente diferente en los dos grupos virales (tabla 4), ya que en los virus de RNA el número de transiciones es menor que en los virus de DNA (71.4 ± 4.1 % frente al 93.5 ± 4.3 %, test de Mann Whitney: $P = 0.010$; figura 13). Recordemos que esto mismo sucedía en el experimento anterior de acumulación de mutaciones.

Tabla 4. Número y tipo de sustituciones fijadas tras 50 pases en los 18 linajes evolucionados. Los valores dentro de cada celda corresponden a los linajes 1, 2 y 3 respectivamente.

Material genético	Especie	Número de mutaciones	% de transiciones	d_s por kb	d_N por kb
ssDNA	Φ X174	7, 3, 5	100, 100, 100	0.8, 0.8, 0.8	1.9, 0.0, 1.2
	G4	4, 1, 3	100, 100, 100	0.7, 0.0, 0.0	0.6, 0.3, 0.9
	f1	4, 6, 6	75, 67, 100	0.6, 1.8, 0.6	0.5, 0.5, 1.2
	Media	4.33 ± 0.59	93.56 ± 4.07	0.67 ± 0.17	0.79 ± 0.18
ss(+)RNA	Q β	12, 15, 23	67, 73, 70	4.3, 2.6, 7.7	1.8, 3.9, 4.6
	SP	14, 18, 18	79, 78, 56	2.5, 5.9, 4.2	3.5, 3.8, 4.2
	MS2	8, 12, 17	100, 67, 59	3.2, 2.2, 5.4	1.3, 4.0, 4.4
	Media	15.22 ± 1.38	72.11 ± 4.08	4.22 ± 0.58	3.50 ± 0.36

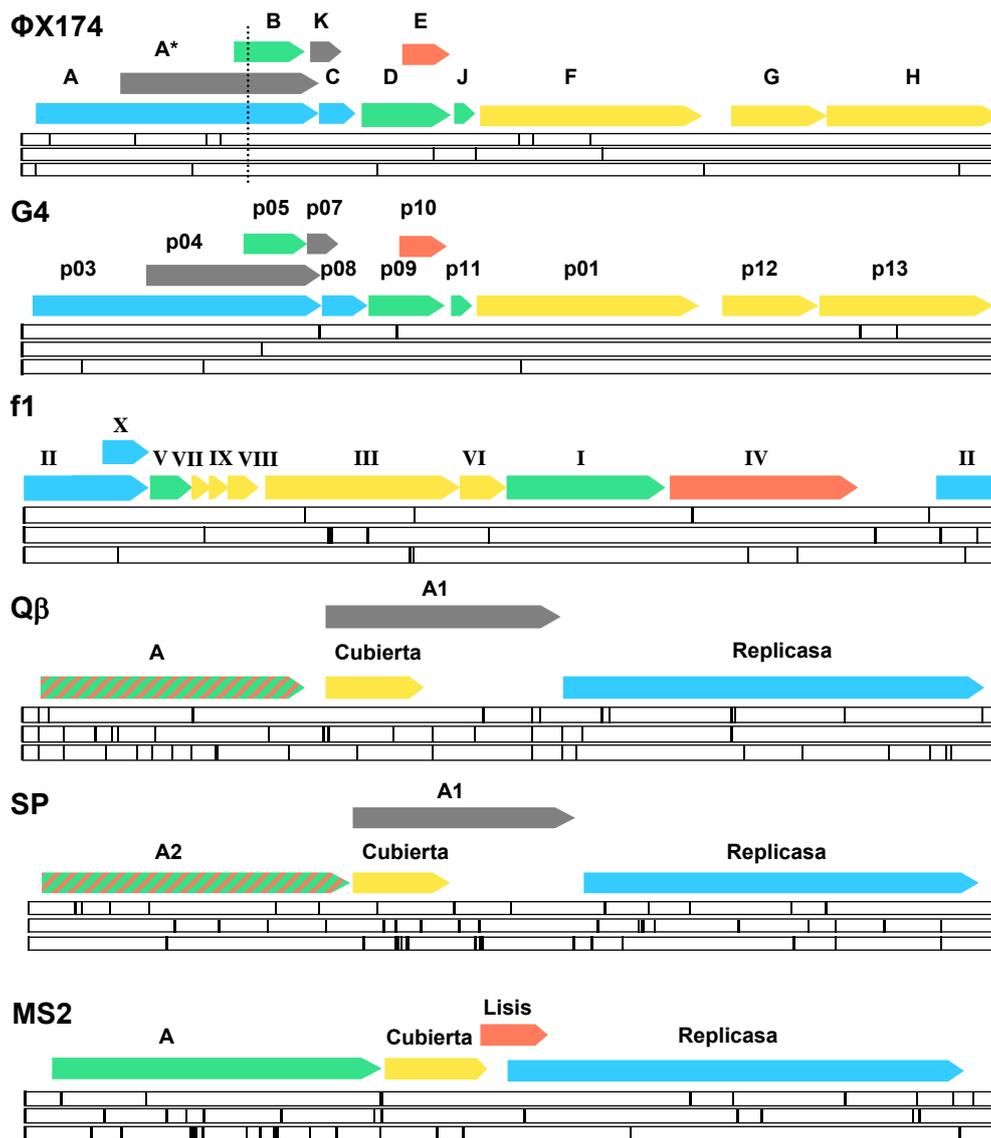


Figura 12. Estructura genómica de los virus Φ X174, G4, f1 Q β , SP y MS2; y localización de las sustituciones nucleotídicas fijadas en los linajes de recuperación de eficacia. Para detalles y leyenda ver figura 8.

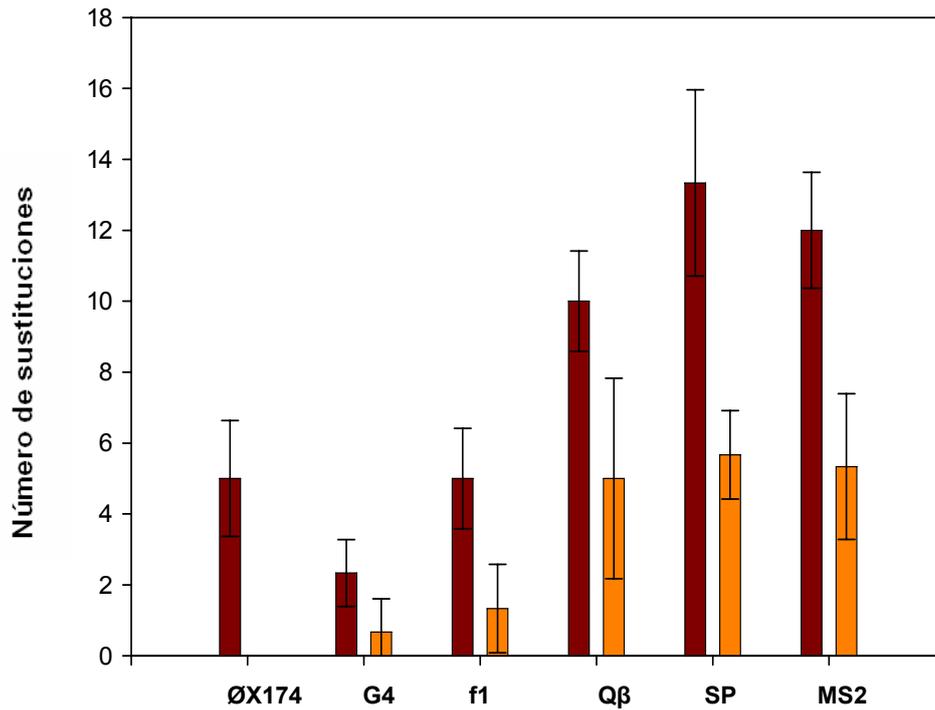


Figura 13. Número medio de transiciones (marrón) y transversiones (naranja) para los virus Φ X174, G4, f1 Q β , SP y MS2 tras los pases de acumulación de mutaciones calva a calva. Las barras de error representan el error estándar.

La selección positiva es un hecho en nuestro experimento, puesto que los virus aumentan fuertemente su eficacia. Sin embargo d_N y d_S son similares (tabla 4), sugiriendo que sólo una pequeña proporción de las sustituciones observadas contribuyen de forma significativa a la adaptación. Por otro lado, hay que reconocer que la interpretación de los valores de d_N/d_S puede ser complicada por la selección actuando sobre mutaciones sinónimas, especialmente en los virus de ssRNA (Kryazhimskiy y Plotkin 2008; Ngandu y col. 2008; Kryazhimskiy y col. 2008).

Las sustituciones que ocurren de forma independiente en dos o más linajes (evolución paralela) son fuertes candidatas a ser selectivamente ventajosas. En los virus de RNA detectamos 8 sustituciones paralelas: A1335G (sinónima) en el gen de la cubierta de MS2; U3581C (sinónima) y G4047 (Ala536Thr) en el gen de la replicasa de SP; y cinco posiciones en Q β , C36U en 5'UTR, U143C (Phe29Leu) en el gen de la maturasa, A1776G (Gln88Arg) y G2215A (Val292Met) en el gen "read-through", y G2350A (sinónima) en la replicasa. Además, vimos una reversión en el gen "read-through" de Q β (G3101U en el linaje 1 y U3101G en el linaje 2). Sin embargo, en los virus de ssDNA no se detectó evolución paralela y ni reversiones. Este tipo de sustituciones se ha detectado previamente en otros virus tanto de RNA como de DNA, tales como el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Cuevas y col. 2002; Remold y col. 2008), el virus del grabado del tabaco (TEV) (Agudelo-Romero y col. 2008), el virus de la ruptura de la flor del Pelargonium (Rico y col. 2006), y los bacteriófagos MS2 (Betancourt 2009), Φ X174 (Cunningham y col. 1997; Wichman y col. 1999; Crill y col. 2000; Wichman y col. 2000), y T7 (Cunningham y col. 1997). Además, las convergencias no se han detectado sólo en estudios de evolución experimental, sino también en aislados naturales, como por ejemplo en secuencias de HIV-1 de diferentes pacientes tratados con el mismo antiviral (Martínez-Picado y col. 2000). El hecho de que no hayamos detectado evolución paralela en los virus de ssDNA puede ser explicado por el escaso número de cambios totales fijados. En el caso de los virus de ssRNA observamos 8 eventos de evolución paralela para un total de 137 cambios, mientras que en el caso de los virus de ssDNA el número total de cambios es de 39, por lo que esperamos sólo 2 posiciones convergentes asumiendo que la probabilidad sea la misma en los diferentes virus.

Para concluir este apartado, remarcar que mientras que las diferencias en tasas de mutación entre virus de ssRNA y ssDNA son del orden de 100 veces (Sanjuán y col. 2010), esta diferencia pasa a ser de menos de 5 veces tanto en términos de adaptación como de sustitución nucleotídica. Una posible explicación es que, aunque todos los linajes han sido evolucionados el mismo número de pases, el número de generaciones en cada especie podría ser diferente. Aunque no se conoce el tamaño de progenie por célula (B) para todos los virus estudiados, en general el de los virus

de RNA es mayor que el de los de DNA. Por ejemplo, en MS2 es de $B = 400$ partículas infecciosas por célula, mientras que en $\Phi X174$ de $B = 180$ (de Paepe y Taddei 2006). Por tanto, el número de generaciones o número de ciclos de infección celular por pase necesario para alcanzar un título final semejante debe ser superior en el caso de los virus de ssDNA. Al haber más generaciones por pase, daría la impresión de que evolucionan más rápido de lo que realmente lo hacen. Para tratar de cuantificar este posible problema, usamos la siguiente ecuación de crecimiento $N_t = N_0 B^g$, donde g el número de generaciones. Si $N_t = 10^9$ y $N_0 = 10^5$ tanto para MS2 como para $\Phi X174$, despejando obtenemos $g = 1.5$ en el caso de MS2 y $g = 1.7$ en el caso de $\Phi X174$. Este problema es más complicado de cuantificar en el caso de f1, puesto que no produce lisis completa y no se producen tamaños de progenie discretos que podamos asociar a generaciones. En todo caso, viendo el conjunto de los resultados, las diferencias en el número de generaciones transcurridas no son suficientes para explicar porqué una diferencia de 100 veces en las tasas de mutación se traduce en diferencias de 5 o menos veces en términos de adaptación o evolución molecular.

Recientemente se ha demostrado que las tasas de mutación están directamente relacionadas con las tasas de evolución, ya que aquellos organismos que presentan tasas de mutación mayores como los virus de RNA o de ssDNA, evolucionan más rápido que los organismos de dsDNA; y que en general, los virus de cadena sencilla presentan tasas de evolución superiores a las de los virus de doble cadena, sin tener en cuenta si el genoma es de RNA o DNA (Sanjuán 2012). Los resultados observados son pues consistentes con el punto de vista clásico de que las altas tasas de mutación de los virus de RNA les permiten adaptarse más rápido a nuevos ambientes o a condiciones fluctuantes (Holland y col. 1982; Wain-Hobson 1993; Domingo 2006), pero parece que las tasas de evolución y adaptación no dependen linealmente de la tasa de mutación. Es posible que la carga genética producida por las mutaciones deletéreas imponga un freno a la evolución, tanto mayor cuanto mayor sea la tasa de mutación y cuanto más cerca esté la población de un pico adaptativo.

Distribución de efectos mutacionales

Mutaciones aleatorias

Para comparar la acción de la selección en virus de ssRNA y ssDNA de forma más precisa, es posible determinar la distribución de efectos de mutaciones puntuales mediante la construcción de mutantes con sustituciones de un único nucleótido por mutagénesis dirigida y la posterior determinación de los efectos que presentan sobre la eficacia. Hemos construido mutantes simples de un virus de ssRNA y de un virus de ssDNA introduciendo 45 mutaciones en el fago $\Phi X174$ (tabla suplementaria 3) y 42 en Q β (tabla suplementaria 4). Observamos que 9 mutaciones son letales en el caso de $\Phi X174$ y 12 en Q β , dando una fracción de letales de $p_l = 0.20$ y $p_l = 0.29$ respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre las dos proporciones (test de Fisher: $P = 0.454$). De las mutaciones letales, todas las encontradas en $\Phi X174$ producen cambios aminoacídicos, mientras que en el caso de Q β , una mutación sinónima (U2379A) y una intergénica (G1329A) producen letalidad.

Tras recuperar virus por transfección, y comprobado mediante secuenciación que la mutación ha sido introducida, llevamos a cabo ensayos de crecimiento para determinar el efecto de las mutaciones sobre la eficacia, realizando en paralelo ensayos con el clon de referencia para obtener la distribución de efectos mutacionales. Las tasas de crecimiento se calcularon también para “mutagénesis control”, en las que no se introdujo cambio alguno con el fin de obtener el error del método en términos de efecto medio y varianza. Las medias y varianzas obtenidas para la colección de mutantes fueron corregidas sustrayendo la media y la varianza de los controles. Tras esta corrección, determinamos que en Q β el coeficiente de selección promedio es de $\bar{s} = -0.359$ incluyendo todos los mutantes (letales y viables) con una varianza de $V(s) = 0.181$. Para las mutaciones viables, $\bar{s}_v = -0.103$ y $V(s_v) = 0.018$. En el caso de $\Phi X174$, el coeficiente de selección promedio es de $\bar{s} = -0.301$, $V(s) = 0.162$, $\bar{s}_v = -0.126$ y $V(s_v) = 0.047$ (tabla 5). Para evaluar diferencias en la eficacia media para mutaciones viables, utilizamos un modelo lineal univariante

Tabla 5. Resultados obtenidos en el experimento de mutagénesis dirigida en los bacteriófagos $\Phi X174$ y $Q\beta$.

	$\Phi X174$	$Q\beta$
N	45	42
p_l	0.20	0.29
\bar{s}	-0.301	-0.359
$V(s)$	0.162	0.181
\bar{s}_v	-0.126	-0.103
$V(s_v)$	0.047	0.018
s_d	-0.195 / -0.176	-0.152 / -0.121
$V(s_d)$	0.031 / 0.038	0.024 / 0.033
p_d	0.52 / 0.57	0.45 / 0.57
p_n	0.23 / 0.28	0.14 / 0.26

N : número de mutantes obtenidos por mutagénesis dirigida.

p_l, p_d, p_n : fracción de letales, deletéreos y neutrales, respectivamente.

\bar{s} : coeficiente de selección promedio.

$V(s)$: varianza de los efectos mutacionales. Los subíndices v y d se refieren a todas las mutaciones viables y a las deletéreas (no letales), respectivamente.

$p_l, \bar{s}, V(s), \bar{s}_v$, y $V(s_v)$ obtenidos directamente de los datos.

s_d y $V(s_d)$ estimados por regresión no lineal a partir de los valores negativos de s y usados para inferir p_d y p_n (se presentan los intervalos de confianza al 95% en estos casos).

con tres factores: especie viral (E , factor fijo principal), tipo de ensayo (M , mutagénesis dirigida o control, factor fijo encajado dentro de E), y calva (C , cada una de los mutantes o control, factor aleatorio encajado dentro de M). En este caso, cada determinación experimental la expresamos como $s_{ij} = \mu + E_i + M_{ij} + C_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$, donde μ es la gran media, M_{ij} es positivo para los ensayos de mutagénesis y negativo para los

ensayos control, y ϵ es el error. Tras el análisis no detectamos diferencias significativas entre los dos virus ($P = 0.633$). Tampoco se observaron diferencias en un test de Mann-Whitney usando todas las mutaciones ($P = 0.336$). La corrección previamente comentada usando los controles implica que nuestras inferencias de medias y varianzas están relativamente libres de error experimental y sesgo debidos a la presencia de mutaciones adicionales o a cambios en las condiciones de ensayo, aunque es posible que los valores de eficacia de algunos mutantes individuales sean alterados por la presencia de mutaciones adicionales.

Atendiendo a la figura 14, la distribución de efectos mutacionales es similar en Q β y en Φ X174, y además es altamente asimétrica, con sustituciones deletéreas de pequeño efecto más abundantes que las de gran efecto, una propiedad compartida prácticamente todos los sistemas modelo estudiados (Eyre-Walker y Keightley 2007). Si nos fijamos en las mutaciones viables con valores negativos de s , podemos llevar a cabo una regresión no lineal entre s y su probabilidad acumulada para caracterizar la forma de la distribución. En Q β , una distribución Gamma con una media de la acción de la selección en contra de las mutaciones deletéreas de $s_d = -0.136 \pm 0.008$, refleja los datos de forma satisfactoria ($R^2 = 0.975$). En el caso de Φ X174, los datos se describen mejor con un modelo exponencial ($R^2 = 0.989$), con un valor esperado de $s_d = -0.186 \pm 0.005$. Los mutantes con valores positivos de s no han sido utilizados para estas inferencias, lo que implica que son considerados como neutrales o beneficiosos, aunque clasificar las mutaciones como neutrales o deletéreas es problemático, ya que la diferencia entre una mutación deletérea de efecto infinitesimal y una mutación neutral es dependiente del tamaño poblacional efectivo y, en el límite, meramente formal.

Los resultados corroboran la conclusión obtenida en el experimento de acumulación de mutaciones de que los valores de robustez en virus de ssRNA y ssDNA son similares, y que el hecho de presentar un ácido nucleico u otro no va a ser determinante en la robustez mutacional. Tampoco difieren en la fracción de mutaciones letales, por lo que son igualmente sensibles también en este aspecto. El fuerte paralelismo entre virus tan diferentes es debido, probablemente, a sus

pequeños genomas con pocas regiones no codificantes, muchas proteínas multifuncionales, y poca redundancia genética (Elena y col. 2006; Belshaw y col. 2008). Por tanto, las diferencias encontradas entre Φ X174 y Q β no son significativas, y el hecho de que en Φ X174 los efectos deletéreos (sin tener en cuenta las mutaciones letales) siga una distribución exponencial y Q β se desvíe ligeramente del modelo, es probablemente debido a que hay mayor cantidad de mutaciones medianamente deletéreas y pocas con efectos fuertemente deletéreos, aunque la fracción de letales sea superior en Q β .

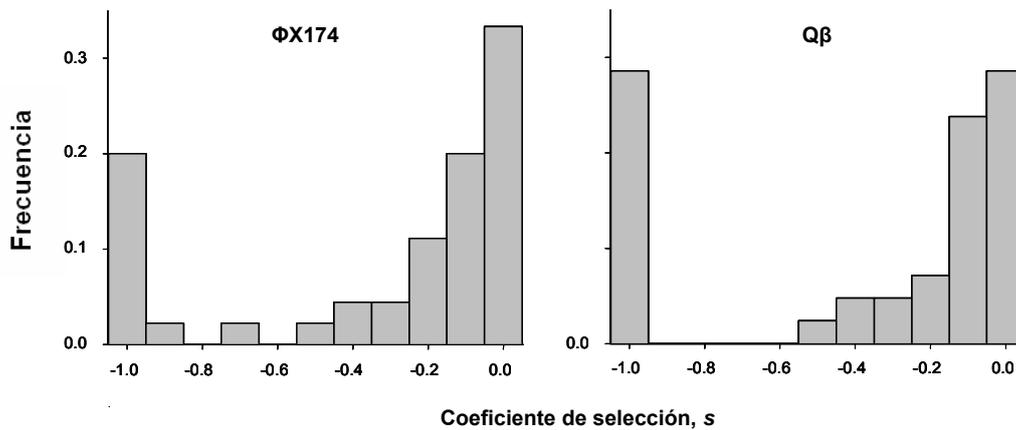


Figura 14. Distribución de los efectos mutacionales causados por sustituciones nucleotídicas simples en los virus Φ X174 y Q β . Se han obtenido 45 y 42 mutaciones simples, respectivamente, por mutagénesis dirigida. Se han realizado ensayos de eficacia para obtener la eficacia relativa y calcular los efectos relativos de cada mutante.

Mutaciones sinónimas

Las mutaciones sinónimas son aquellas que no producen un cambio del aminoácido codificado. Por ello, podría pensarse que no van a ser mutaciones que vayan a

afectar a la eficacia. Sin embargo, algunas sustituciones sinónimas pueden ser diana de la selección directamente a nivel del RNA o del DNA. Por tanto, la selección sí puede actuar sobre sustituciones sinónimas, y esto debe ser más relevante en virus con genomas altamente compactos debido a que sus propias secuencias codificantes pueden verse envueltas en procesos tales como regulación génica, tráfico celular, o en la encapsidación (Novella 2003). Por ejemplo, algunas estructuras secundarias adoptadas por los genomas de los virus de RNA se encuentran bajo fuerte presión selectiva porque regulan la traducción (Olsthoorn y van Duin 1996; Watts y col. 2009; Groeneveld y col. 1995; Klovins y col. 1997), controlan el inicio de la replicación (Klovins y col. 1998), o son dianas para RNasas celulares (Klovins y col. 1997).

Para poder determinar los efectos que producen este tipo de mutaciones, construimos de nuevo mutantes simples por mutagénesis dirigida en Q β y Φ X174, pero en este caso con sustituciones sinónimas al azar, y obtuvimos sus valores de eficacia. Creamos 26 mutantes simples sinónimos para Φ X174 (tabla suplementaria 5) y 27 para Q β (tabla suplementaria 6), todos ellos viables. En el caso de Φ X174, las mutaciones tienen un efecto medio de +0.005, con una varianza de 0.001, y sólo una mutación de las 26 es significativamente deletérea (A955G en la secuencia GQ153915, $s = -0.076 \pm 0.049$). Para Q β , la media de efectos en la eficacia es de -0.030 con una varianza de -0.004, y cinco de las 27 mutaciones son significativamente deletéreas. Estas cinco se encuentran todas en el gen de la matorasa: C628U ($s = -0.087 \pm 0.007$), C1048U ($s = -0.056 \pm 0.005$), C1118A ($s = -0.178 \pm 0.080$), U1186G ($s = -0.040 \pm 0.009$), y C1303A ($s = -0.202 \pm 0.028$), refiriéndonos a las posiciones según el número de acceso de GenBank GQ153931. Estas mutaciones deletéreas fueron re-evaluadas con los controles apropiados para asegurarnos que el efecto observado no era debido a cambios adicionales en el genoma, como se ha descrito en el apartado anterior. Por tanto, las mutaciones sinónimas son más frecuentemente deletéreas en Q β que en Φ X174, aunque algunos de los mutantes ensayados podrían ser no neutrales pero con un efecto tan pequeño que impediría su detección con la metodología utilizada. Comparando directamente los valores s promedio en ssRNA y ssDNA, confirmamos que los efectos de las mutaciones sinónimas en virus de ssRNA son superiores a los de ssDNA (test de

Mann-Whitney: $P = 0.006$). No se puede descartar que, en algunos casos, algunas mutaciones compensatorias puedan haberse fijado durante los ensayos de eficacia, llevando a una subestima de s , pero en todo caso esto debería ocurrir más frecuentemente en Q β debido a su mayor tasa de mutación y no alteraría pues nuestra conclusión.

Tasas óptimas de mutación

La tasa de mutación que maximiza la adaptación a nuevos ambientes (U_{opt}) puede predecirse bajo ciertas asunciones simples, como la ausencia de *hitch-hiking* genético y recombinación (Orr 2000), o bajo un modelo de efectos constantes sobre la eficacia (Johnson y Barton 2002). De acuerdo con el modelo de Orr (Orr 2000), $U_{opt} = s_H$, donde s_H es la media armónica del coeficiente de selección en contra de las mutaciones deletéreas. Por tanto, usando los valores obtenidos previamente mediante mutagénesis dirigida en Q β y Φ X174, podemos comparar las tasas de mutación espontánea con sus óptimos teóricos (figura 15). La tasa de mutación observada en Q β es 0.5-1.0 s/g/c (datos no publicados obtenidos en nuestro laboratorio), mientras que su óptimo es de 0.20-0.31 s/g/c, calculado como la media armónica de los coeficientes de selección en contra de las mutaciones deletéreas a partir de nuestra colección de mutantes simples por lo que este virus parece tener una tasa similar o ligeramente superior a la de su valor óptimo. En el caso de Φ X174, el valor estimado en el laboratorio es de 0.005-0.007 s/g/c (Raney y col. 2004; Cuevas y col. 2009a), mientras que su valor óptimo sería 0.08-0.13 s/g/c, por lo que presentaría una tasa de mutación subóptima. Es importante destacar que, aunque U_{opt} representa la tasa óptima a la que los organismos van a adaptarse a unas nuevas condiciones, sólo será así si el valor de eficacia en el que se encuentra la población está lejos del máximo, ya que a medida que la población se acerca al óptimo de eficacia, una menor tasa de mutación será favorecida, llegando al extremo

de, si la población se encuentra totalmente adaptada, valores de tasa de mutación de cero serán los óptimos, puesto que cualquier mutación va a ser deletérea (o neutra). De este modo, el cálculo de tasas de mutación óptima ha de hacerse teniendo en cuenta esta asunción.

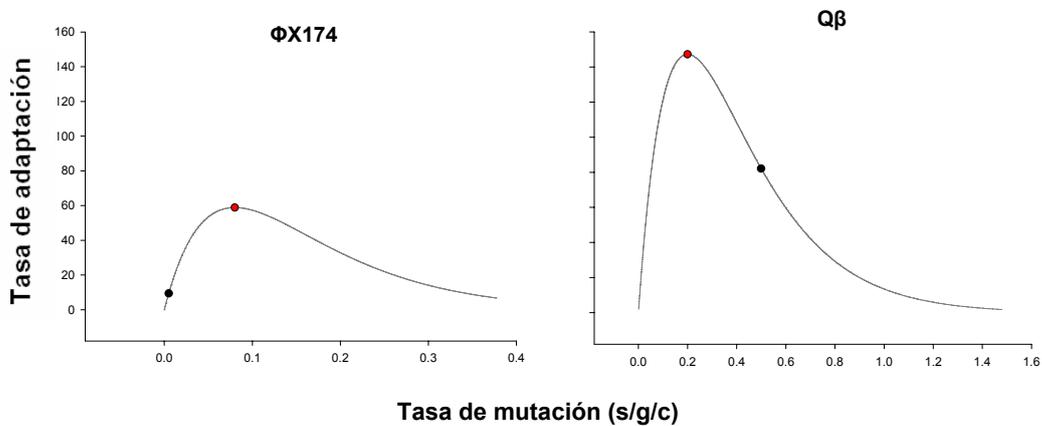


Figura 15. Distribución de la tasa de adaptación en función de la tasa de mutación (s/g/c) para $\Phi X174$ y $Q\beta$. Indicada en unidades arbitrarias, calculada según el modelo de Orr $k = 2NUp_b s_H e^{-U/s_H}$, donde k es la tasa de adaptación, N el tamaño poblacional, U la tasa de mutación, p_b la proporción de mutaciones beneficiosas, y s_H la media armónica del coeficiente de selección en contra de las mutaciones deletéreas (s_H 0.08 para $\Phi X174$ y 0.20 para $Q\beta$) (Orr 2000) Los puntos rojos corresponden a las tasas óptimas de mutación, mientras que los puntos negros a las tasas de mutación obtenidas en el laboratorio.

Mutagénesis química en un virus de DNA de cadena sencilla

Como se ha comentado en el apartado anterior, parece que $\Phi X174$ se encuentra por debajo de su tasa óptima de mutación. Para poder comprobar empíricamente esta predicción, se ha evolucionado el virus en presencia de un agente mutágeno que incremente su tasa de mutación y se ha determinado cómo afecta este tratamiento a la adaptación viral. Para ello, hemos llevado a cabo 50 pases de evolución para

adaptar una población de baja eficacia a la cepa *IJ1862*, en presencia de diferentes dosis de 5-FU. Se escogieron cuatro tratamientos distintos: control en ausencia de mutágeno, 2 ng/ μ L, 5 ng/ μ L y 10 ng/ μ L de 5-FU (cinco réplicas por tratamiento).

El primer paso es determinar si el 5-FU induce mutaciones en el genoma de Φ X174, para lo cual se ha obtenido la frecuencia de mutación en los pases 5, 10, 20, 35, y 50 (figura 16) mediante ensayos en placa de los virus en el hospedador no permisivo *gro89*, donde sólo podrán formar calvas aquellos virus que presenten ciertas mutaciones en la región N-terminal de la proteína A (leucina en la posición 77; treonina, valina o prolina en la 80; y alanina, glicina o valina en la 82). En los primeros pases, los controles presentan alrededor de $(6.12 \pm 6.01) \times 10^{-6}$ mutantes, y los linajes evolucionados a 10 ng/ μ L de 5-FU alrededor de $(5.75 \pm 3.09) \times 10^{-5}$ mutantes, por lo que existen diferencias de un orden de magnitud entre ellos, aunque cabe destacar que la varianza de los valores es muy grande. Por tanto, a alta dosis de 5-FU se está incrementando la frecuencia de mutación en un orden de magnitud (con lo que esperamos acercarnos a los valores óptimos de mutación), aunque a dosis menores (5 ng/ μ L o menos) se induce un nivel bajo o nulo de mutaciones. En los últimos pases, la frecuencia de mutación disminuye hasta $2.98 \times 10^{-8} \pm 2.02 \times 10^{-8}$ en los linajes control, y llegando hasta cero en los evolucionados a la máxima dosis de mutágeno. Con estos resultados, podemos asumir que el 5-FU aumenta de forma significativa la tasa de mutación del virus, (ANOVA: $P = 0.005$), aunque el descenso de la frecuencia de mutantes observado en los últimos pases es significativo (ANOVA: $P = 0.004$).

El presente experimento se inició partiendo del mismo clon viral de baja eficacia del experimento de acumulación de mutaciones (el linaje 2 de Φ X174 utilizado posteriormente para los experimentos de recuperación de eficacia), a partir del cual se han obtenido los distintos linajes. Los tiempos de recogida se ajustaron en cada linaje según el título inicial y final, calculando para cada pase las tasas de crecimiento según su tratamiento. Tras los 50 pases, todos los linajes parecen estar adaptados a sus condiciones, ya que en al menos los últimos 20 pases de la evolución, los valores de eficacia se mantienen estables (datos no mostrados). El valor medio final de

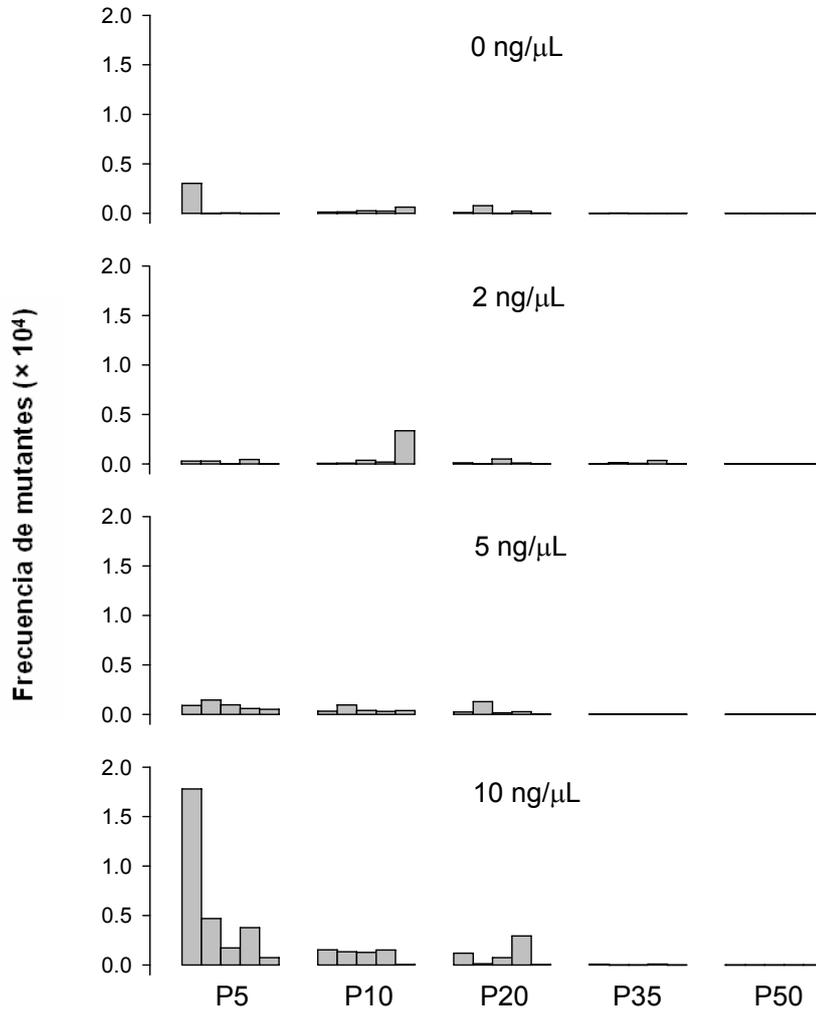


Figura 16. Frecuencia media de mutación para los linajes evolucionados en presencia de 0, 2, 5 y 10 ng/μl de 5-FU, plaqueados en *E. coli gro89* en los pases 5, 10, 20, 35 y 50 en todos los tratamientos.

eficacia obtenido en presencia de la dosis de 5-FU a la que se llevó a cabo la evolución fue de 1.139 ± 0.025 para los linajes control, 1.253 ± 0.022 para los linajes evolucionados a $2 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 1.491 ± 0.036 a $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$, y 1.931 ± 0.062 para los linajes a $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Para todas las dosis utilizadas, la eficacia media de los linajes evolucionados medida en su propio tratamiento es significativamente superior al ancestro, lo que nos indica que todos se han adaptado a las condiciones impuestas durante los 50 pases de evolución (t-test: $P < 0.007$). Además, existe una correlación positiva entre la concentración de 5-FU y la adaptación (correlación de Pearson: $r = 0.966$, $P < 0.001$). En ensayos similares en los que todos los linajes evolucionados en los diferentes tratamientos los llevamos a cabo en ausencia de mutágeno, hemos obtenido resultados igualmente significativos para los linajes evolucionados en presencia de $2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (1.169 ± 0.015 y 1.214 ± 0.011 respectivamente; t-test: $P = 0.002$ y $P < 0.001$). Sin embargo, en los linajes evolucionados en $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de 5-FU no se observan diferencias de eficacia con el ancestro al crecerlos en ausencia de la droga (1.015 ± 0.025 ; t-test: $P = 0.963$), por lo que podemos concluir que el bacteriófago se ha adaptado de forma dependiente de la dosis (figura 17). Los resultados obtenidos no parecen indicar que el incremento de la tasa de mutación de ΦX174 produzca un beneficio al virus en términos de adaptabilidad al hospedador, aunque por otra parte, los virus podrían haberse adaptado específicamente al mutágeno o a los cambios fisiológicos celulares debidos a la presencia del 5-FU.

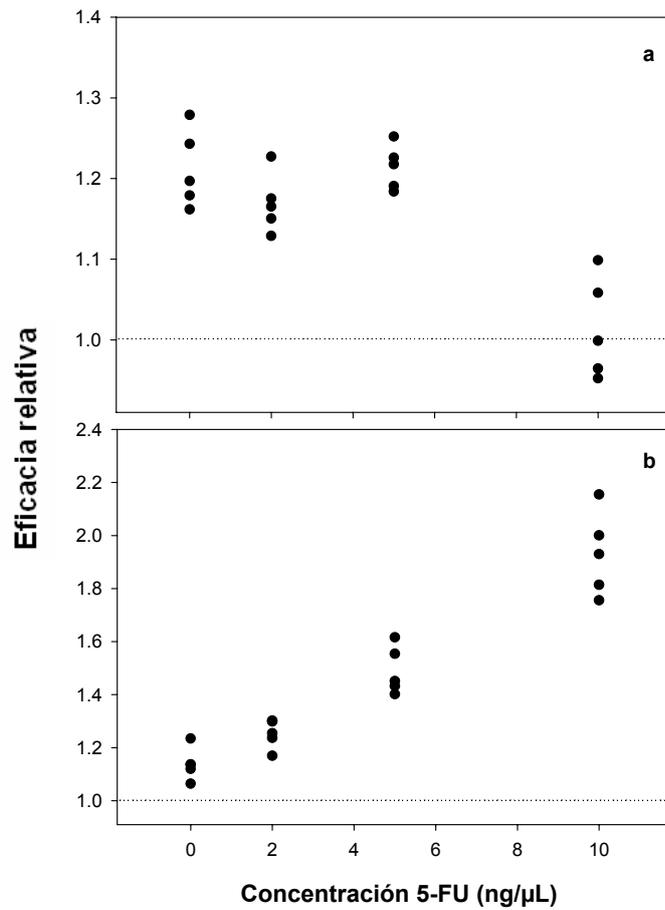


Figura 17. Eficacia relativa de los linajes en ausencia y presencia de 5-FU. a) Eficacia relativa para los linajes evolucionados a 0, 2, 5 y 10 ng/μl en ausencia de mutágeno. b) Eficacia relativa para los linajes evolucionados a 0, 2, 5 y 10 ng/μl en presencia de su propio tratamiento. Los círculos representan los 5 linajes para cada tratamiento (cada círculo es una media de las tres réplicas de las competencias).

Como se ha comentado, tras los pases de evolución se observa una adaptación específica en los linajes evolucionados a altas dosis de 5-FU. Para determinar las bases moleculares de esta adaptación, se han secuenciado los linajes evolucionados a concentración de 10 ng/ μ L y se ha obtenido la secuencia consenso para cada uno de los cinco linajes evolucionados a alta dosis. Tal y como se observa en la figura 18, se han fijado entre 2 y 6 mutaciones por linaje, la mayoría de las cuales en las proteínas A y A*, implicadas en la síntesis de las cadenas virales y en inhibir la síntesis de DNA del hospedador. En este caso, todas las mutaciones excepto una son sinónimas. El resto de mutaciones se encuentran en proteínas relacionadas con morfogénesis y formación de la cápside, y todas ellas son no sinónimas. Además, se han detectado dos mutaciones en regiones intergénicas, en las posiciones 972 y 981, que forman parte de la misma estructura secundaria. De todas las mutaciones descritas, seis de ellas presentan evolución paralela, es decir, convergen en al menos dos de los linajes evolucionados a altas dosis de 5-FU. Son las posiciones 572, 781, 972, 981, 1247 y 3166, sugiriendo que son beneficiosas para el crecimiento del virus en presencia del mutágeno. Hemos secuenciado estas posiciones en los linajes evolucionados en ausencia de 5-FU para determinar la presencia o ausencia de cada una, y determinar si son adaptaciones al mutágeno o al hospedador. Sólo una de ellas, la posición intergénica 981, está presente en los linajes control, de lo cual se deduce que las otras cinco posiciones parecen estar relacionadas directamente con la adaptación al 5-FU, aunque como se ha comentado, la posición 972 está relacionada con la 981 ya que pueden aparear estabilizando la estructura secundaria de esa región.

Para determinar los efectos en la eficacia de las mutaciones convergentes y demostrar si son beneficiosas para el crecimiento del virus en presencia de 5-FU, hemos creado una serie de mutantes por mutagénesis dirigida. Para ello, al clon fundador le hemos introducido las mutaciones convergentes (mutantes directos) y a los linajes evolucionados a 10 ng/ μ L de 5-FU les hemos revertido las mutaciones convergentes, introduciendo en su lugar el nucleótido ancestral (revertientes).

	A, A*			K		D / E			F		G	H	
	T4664C syn	T4688G syn	A4796G syn	A100T Leu502Phe	C121T syn	T572C syn / Val 2Ala	A781G Asn131Ser / Thr72Ala	A972G	C981T	A1247G Ile83Val	A1388G Asn130Asp	C2711T Ala106Val	C3166T Ala79Val
10.1		■					■		■	■			
10.2			■	■			■	■		■			■
10.3	■									■			
10.4						■		■				■	■
10.5					■	■			■		■		

Figura 18. Sustituciones nucleotídicas observadas en la secuencia consenso de los 5 linajes evolucionados a 10 ng/μl de 5-FU. Está representado el tipo y la posición genómica de cada sustitución. Para las sustituciones no sinónimas, la posición aminoacídica y el cambio están indicados. Las posiciones donde no se indican los genes corresponden a regiones no codificantes. Los genes A y A* solapan y se encuentran en la misma pauta de lectura, mientras que el gen K solapa con la parte final pero en distinta pauta. Los genes D y E también solapan en distinta pauta.

En total, hemos obtenido 16 clones con sustituciones simples: 4 directos y los 12 posibles revertientes. Hemos ensayado los 16 mutantes junto con el clon fundador de baja eficacia y con los cinco linajes evolucionados en presencia de 10 ng/μl de 5-FU para determinar la eficacia relativa de cada uno de ellos (tabla 6). Se observa que de forma general los mutantes directos son más eficaces que el clon fundador. Los revertientes, aún siendo más eficaces que el clon fundador y los mutantes directos, presentan una eficacia menor que los linajes evolucionados en presencia de 5-FU. Concretamente, la mutación T572C está asociada a un incremento significativo de

eficacia (ANOVA: $P = 0.001$). Su adición al clon ancestral le incrementa un 69% la eficacia al crecer en presencia de 10 ng/ μ l de 5-FU ($W = 1.693 \pm 0.092$), mientras que la reversión en los clones evolucionados disminuyen la eficacia tanto en el linaje 4 (de 2.930 ± 0.296 a 2.526 ± 0.486) como en el linaje 5 (de 3.308 ± 0.191 a 1.883 ± 0.219). Para el resto de las mutaciones, los efectos son menos significativos, A781G (ANOVA: $P = 0.044$), A1247G (ANOVA: $P = 0.041$) y C3166T (ANOVA: $P = 0.089$).

Tabla 6. Eficacia relativa de la colección de mutantes tras la evolución en presencia de 5-FU, para la introducción de las mutaciones convergentes en el clon ancestral y para la reversión de las mutaciones convergentes en los virus evolucionados.

Fondo genético	Eficacia relativa inicial	Mutación	Eficacia relativa tras introducir la mutación	Eficacia relativa tras revertir la mutación
Clon fundador	1.166 ± 0.096	572	1.973 ± 0.088	
		781	1.909 ± 0.193	
		972	1.424 ± 0.251	
		1247	1.034 ± 0.008	
		3166	1.144 ± 0.506	
10.1	3.483 ± 0.285	781		2.771 ± 0.552
		1247		2.757 ± 0.567
10.2	4.237 ± 0.513	781		3.928 ± 0.567
		972		1.611 ± 0.228
		1247		4.025 ± 0.329
		3166		3.311 ± 0.190
10.3	4.688 ± 0.396	1247		3.455 ± 0.485
10.4	3.415 ± 0.281	572		2.945 ± 0.462
		972		3.745 ± 0.264
		3166		2.834 ± 0.158
10.5	3.856 ± 0.181	572		2.195 ± 0.209

El hecho de que nuestras poblaciones se hayan adaptado a la presencia del mutágeno y no al hospedador dificulta cualquier conclusión acerca de si la tasa de mutación del virus está o no cerca de su óptimo. Sin embargo, hemos conseguido adaptar un virus de ssDNA a condiciones mutagénicas, algo que se ha descrito en varias ocasiones en virus de RNA (Sierra y col. 2000; Crotty y col. 2001; Anderson y col. 2004; Domingo y col. 2005; Graci y col. 2008; Arribas y col. 2011) pero no en virus de DNA. Existe un precedente en el que se evolucionó el fago T7 en condiciones de alta mutagénesis con el fin de causar la extinción de la población por mutagénesis letal, pero no se pudo demostrar adaptación al mutágeno (Springman y col. 2009).

Discusión general

Los bacteriófagos son excelentes herramientas para estudiar aspectos fundamentales de la evolución, ya que pueden estudiarse de manera sencilla en el contexto de sus hospedadores naturales (Sanjuán y Domingo-Calap 2011). Junto a otros tipos de virus, representan poblaciones en las que podemos ser capaces de medir parámetros evolutivos, así como comprobar y plantear hipótesis evolutivas, ya que acumulan diversidad genética a una escala temporal observable por nosotros (Drummond y col. 2003).

Los eucariotas presentan genomas con una gran cantidad de regiones no codificantes y un elevado grado de redundancia que hacen que las mutaciones puntuales tengan un pequeño efecto sobre la eficacia (Crow y Wagner 2006; Qian y col. 2010). Sin embargo, los virus presentan generalmente pequeños genomas muy compactos, con pocas zonas intergénicas y genes solapantes, lo que les impone fuertes constricciones funcionales y explica por qué muchas mutaciones no son toleradas. La comparación directa entre virus de RNA y DNA para intentar detectar

diferencias en sus propiedades evolutivas desde un punto de vista experimental puede ayudarnos a comprender aspectos generales de su evolución en la naturaleza.

Como se ha comentado, los virus de RNA presentan tasas de mutación superiores que los organismos basados en DNA (Drake y col. 1998; Drake y Holland 1999; Sniegowski y col. 2000; Sanjuán y col. 2010), sobretodo debido a la ausencia de mecanismos de corrección de errores. Generalmente, suele admitirse que los virus de RNA evolucionan más rápido (Holland y col. 1982), pero recientemente se ha visto que ciertos virus de DNA evolucionan a tasas similares a las de los virus de RNA en la naturaleza (Duffy y col. 2008), aunque esto no ha sido testado experimentalmente hasta ahora. Por ejemplo, el parvovirus canino y el virus de la panleucopenia felina presentan unas tasas estimadas de sustitución de alrededor de 10^{-4} sustituciones por sitio por año (Shackelton y col. 2005), dentro del rango de las estimas para los virus de RNA de 10^{-2} a 10^{-5} sustituciones nucleotídicas por sitio y año (Jenkins y col. 2002; Hanada y col. 2004). Estimias similares se han determinado para otros virus de ssDNA como el parvovirus humano B19 (Shackelton y Holmes 2006), el circovirus SEN-V (Umemura y col. 2002) y el virus del rizado amarillo del tomate (Duffy y Holmes 2008).

Para comparar las propiedades evolutivas de los virus de ssRNA y de ssDNA hemos utilizado seis especies de pequeño tamaño genómico. Lo primero que hemos intentado responder es si la capacidad de tolerar mutaciones en los virus difiere en ambos grupos. Mediante un experimento de acumulación de mutaciones en presencia de ácido nitroso, donde se generaron mutaciones de forma aleatoria en los genomas gracias a los fuertes cuellos de botella y a la presencia del mutágeno, pudimos disminuir la eficacia de todos los virus. La combinación de cuellos de botella y mutagénesis se ha demostrado como la vía más eficiente de conseguir extinción viral (Sierra y col. 2000), y hemos prolongando los pases hasta que los virus han experimentado la máxima pérdida de eficacia compatible con su manejo en nuestras condiciones de laboratorio (alrededor del 70% de pérdida). El siguiente paso fue caracterizar las bases moleculares para comparar el número de mutaciones acumulado en las distintas especies y determinar posibles diferencias significativas

entre virus de ssRNA y ssDNA. Tras el análisis de las secuencias, hemos visto que para una misma pérdida de eficacia, todos los virus acumulan un número de mutaciones semejante, indicando que el efecto medio de las mutaciones es parecido en virus de ssRNA y de ssDNA. Este resultado contrasta con las grandes diferencias que existen entre estos dos grupos a otros niveles como, por ejemplo, en términos de tasas de mutación o mecanismos replicativos y de expresión génica. Esto también queda patente tras el experimento de mutagénesis dirigida, donde mediante la introducción de mutaciones puntuales en el genoma de un virus de ssRNA y uno de ssDNA, hemos visto que tanto el efecto como la distribución de las mutaciones no difieren de forma significativa. Como hemos llevado a cabo ambos experimentos con los mismos virus, mismo hospedador, y mismas condiciones de crecimiento, parece adecuado comparar los dos métodos. El cálculo de los efectos mutacionales se desvía según el método empleado, lo cual puede ser debido a varias razones (experimento de acumulación de mutaciones: $s_{DNA} = -0.050$, $s_{RNA} = -0.047$; experimento de colección de mutantes simples: $s_{\phi X174} = -0.301$, $s_{Q\beta} = -0.359$). En primer lugar, en los experimentos de acumulación de mutaciones por pases calva-calva no es posible detectar mutaciones letales o altamente deletéreas, lo cual tiene como consecuencia una subestima de la intensidad de la selección en estos casos. En segundo lugar, en virus de RNA, las mutaciones tienden a tener menos efectos conforme se acumulan en los genomas (epistasia antagonista), aunque se piensa que debe ocurrir lo mismo en virus de DNA de pequeño tamaño genómico (Burch y Chao 2004; Sanjuán y col. 2004a; Sanjuán y col. 2010). Por tanto, los experimentos de acumulación de mutaciones tenderían a subestimar el efecto individual de cada mutación. Por ello, no es posible comparar directamente los efectos mutacionales obtenidos en los dos tipos de experimento, aunque de todos modos, en ambos casos se concluye que las diferencias entre virus no son significativas. Sin embargo, si nos fijamos únicamente en las sustituciones sinónimas, sí que se detectan diferencias significativas en los efectos que presentan sobre la eficacia en virus de ssRNA y ssDNA. Esto se explica, en gran parte, por el hecho de que en el caso de los virus de RNA, el plegamiento del material genético influye fuertemente en la encapsidación (Witherell y Uhlenbeck 1989) y ciertas mutaciones, aunque no modifiquen el aminoácido que codifican, provocan cambios en la estructura secundaria que pueden

tener efectos importantes sobre el virus (Skripkin y col. 1990; Skripkin y Jacobson 1993; Beekwilder y col. 1995; Beekwilder y col. 1996). Además, la estructura secundaria del RNA puede desempeñar distintas funciones tanto en replicación, como en transcripción y en encapsidación (Novella 2003).

Los experimentos de acumulación de mutaciones son interesantes puesto que nos dan una idea general de los efectos mutacionales en los organismos, pero si queremos un análisis más fino y determinar exactamente qué ocurre en determinadas posiciones es necesario analizar la distribución de efectos mutacionales mediante mutagénesis dirigida. Aquí hemos utilizado sólo dos especies (Φ X174 y Q β) pero para generalizar los resultados obtenidos hemos querido considerar un conjunto de datos más amplio, utilizando tanto nuestra colección de mutantes aleatorios (incluyendo la de mutaciones sinónimas) así como estudios previos de mutagénesis dirigida llevados a cabo en VSV (Sanjuán y col. 2004b), TEV (Carrasco y col. 2007) y f1 (Peris y col. 2010). El conjunto de datos total es de 322 mutaciones, 122 sinónimas y 200 no sinónimas, y engloba virus de ssRNA y ssDNA de diferentes familias (tabla 7). Comparando los resultados obtenidos de las cinco especies, vemos que la fracción de letales oscila entre 0.20 y 0.41, siendo unos valores bastante elevados de letalidad. El intervalo mencionado no es muy grande si tenemos en cuenta que estamos comparando un grupo muy diverso, donde tenemos virus de ssRNA de polaridad positiva y negativa, y virus de ssDNA, además de tener hospedadores muy diferentes (bacterias, plantas y animales). La fracción de letales es mayor en virus eucariotas que en bacteriófagos, y mayor en los virus de ssRNA que en los de ssDNA, aunque la metodología utilizada en cada caso puede estar influyendo en los resultados obtenidos. Si nos fijamos en las mutaciones viables (sinónimas y no sinónimas), la media de los coeficientes de selección es bastante constante entre los virus mencionados, de -0.103 a -0.132. En cuanto a la varianza de los efectos mutacionales, oscila entre 0.018 y 0.047. Vemos que los coeficientes son negativos y razonablemente altos, indicando que los efectos mutacionales son marcados y que la mayor parte de las mutaciones con deletéreas, además de que existe una mayor cantidad de mutaciones de pequeño efecto mutacional que de gran efecto (Eyre-Walker y Keightley 2007). Fuertes efectos mutacionales implican que las mutaciones

deletéreas son eliminadas de forma más eficiente de la población, favoreciendo la difusión de las mutaciones beneficiosas (Orr 2000), aunque la relación entre la capacidad de evolucionar y la robustez es aún controvertida.

Tabla 7. Efectos en la eficacia^a de sustituciones aleatorias sinónimas (S) y no sinónimas (NS) en varias especies virales.

Material genético	Virus ^b	Número		Media ^c		Varianza ^c		Fracción letalidad %	
		S	NS	S	NS	S	NS	S	NS
ssRNA	VSV	8	35	-0.143	-0.532	0.122	0.194	13	43
	TEV ^d	11	52	-0.173	-0.509	0.120	0.217	9	44
	Q β	36	33	-0.052	-0.424	0.029	0.184	3	33
	Total	55	120	-0.090	-0.492	0.060	0.200	5	41
ssDNA	Φ X174	38	28	-0.007	-0.352	0.003	0.170	0	21
	f1	29	52	-0.003	-0.364	0.002	0.163	0	24
	Total	67	80	-0.005	-0.360	0.002	0.164	0	23
Total		122	200	-0.043	-0.439	0.030	0.189	2	34

^a Definido como ratio de tasas de crecimiento.

^b Los valores utilizados son para VSV (Sanjuán y col. 2004b), TEV (Carrasco y col. 2007), el conjunto de datos obtenidos en la presente tesis en los dos experimentos de mutagénesis dirigida para Q β y Φ X174, y f1 (Peris y col. 2010).

^c Mutaciones letales incluidas.

^d Valores de eficacia transformados a las unidades usadas en la presente tesis ($W_{i0} = r_i/r_0$; $s_i = r_i/r_0 - 1$).

En los tres virus de ssRNA estudiados, los efectos mutacionales de las sustituciones sinónimas son alrededor de 5 veces inferiores que los de las sustituciones no sinónimas ($\bar{s} = -0.090$ frente a $\bar{s} = -0.492$, ANOVA: $P < 0.001$) y la fracción de letales

es 8 veces menor (5% frente al 41%, test exacto de Fisher: $P < 0.001$). En el caso de los dos virus de ssDNA, los efectos de las mutaciones sinónimas son 70 veces inferiores a los de las no sinónimas ($\bar{s} = -0.005$ frente a $\bar{s} = -0.360$, ANOVA: $P < 0.001$), y ninguna de las sustituciones sinónimas ensayadas es letal, en contra del 23% de letalidad de las no sinónimas (ANOVA: $P < 0.001$). Los datos confirman que las sustituciones sinónimas son más deletéreas en el caso de los virus de ssRNA que en los de ssDNA (ANOVA: $P < 0.001$). Con los resultados obtenidos, vemos que las mutaciones sinónimas tienen mayor efecto en virus de ssRNA, ya que este tipo de selección contribuye aproximadamente a un 18% del total de los efectos mutacionales bajo nuestras condiciones de ensayo y un 5% de las mutaciones son letales. Por el contrario, en virus de ssDNA tan sólo un 1.4% de las sustituciones de este tipo tienen efectos sobre la eficacia, y no se detecta ninguna que provoque letalidad. Confirmando las conclusiones obtenidas en nuestros experimentos, el efecto de la selección a nivel de proteínas, calculado como el efecto neto de las mutaciones no sinónimas (sustrayendo el efecto medio de las sustituciones sinónimas del efecto medio de las no sinónimas), es notablemente poco variable entre los 5 virus bajo estudio, y va desde $\bar{s} = -0.336$ hasta $\bar{s} = -0.389$. Por tanto, aunque la selección es más fuerte a nivel proteico (tanto en ssRNA como en ssDNA), la selección a nivel del RNA juega también un papel importante en el caso de los virus de ssRNA.

El efecto sobre la eficacia de las mutaciones aleatorias es relevante para la evolución ya que determina, por ejemplo, la fracción de sitios nucleotídicos que evolucionan neutralmente y por tanto, la tasa a la que las poblaciones divergen por deriva genética. Además, el hecho de que las mutaciones tengan un fuerte efecto deletéreo indica que hay pocos mecanismos de robustez, lo que resulta en una gran variación fenotípica y una fuerte selección para las mutaciones beneficiosas (Lenski y col. 2006; Frank 2007; Wagner 2008). Los efectos mutacionales también son importantes para los procesos de pérdida de eficacia. En condiciones naturales, los virus experimentan fuertes cuellos de botella durante los cuales se van a fijar mutaciones

de forma aleatoria, y las consecuencias de este proceso para la eficacia viral son altamente dependientes de cómo de deletéreas son esas mutaciones (Butcher 1995).

A partir de los virus de baja eficacia obtenidos por acumulación de mutaciones, en los que el número de mutaciones fijado es similar en virus de ssRNA y ssDNA, hemos llevado a cabo un experimento de recuperación de eficacia para determinar diferencias en la adaptación entre estos virus. Las trayectorias que siguen todas las especies son similares: un incremento rápido en la eficacia muy marcado y una posterior fase de menor variación, aunque los virus de ssDNA están un poco retrasados en el tiempo. Esta dinámica es una observación común en los microorganismos durante experimentos de evolución, donde la ganancia de eficacia es rápida al principio pero tiende a decelerar con el tiempo (Novella y col. 1995; Elena y col. 1998; Burch y Chao 1999; Wichman y col. 1999; Elena y Lenski 2003). Prácticamente todos los linajes han llegado a recuperar la eficacia hasta los valores óptimos. Se ha demostrado previamente que las poblaciones que evolucionan en un mismo ambiente pueden llegar al mismo valor de máxima eficacia (Travisano y col. 1995; Moore y col. 2000), aún con diferentes trayectorias evolutivas (MacLean y Bell 2003; Nguyen y col. 2012).

Mientras que los virus de RNA presentan sus propias replicasas, los virus de ssDNA utilizan las polimerasas de sus hospedadores, lo que puede afectar a la adaptación a determinados ambientes o condiciones, ya que parece más sencillo modificar la tasa de mutación de organismos que codifican sus propias polimerasas. Por tanto, los virus de RNA van a poder modificar sus tasas de mutación en función del ambiente de forma, aparentemente, más fácil que los virus de ssDNA. Se piensa que las altas tasas de mutación de los virus de RNA pueden ser una adaptación frente a la infección de hospedadores con sistema inmunitario (Belshaw y col. 2008), ya que los virus necesitan generar rápidamente mutaciones que les permitan escapar al ataque por el sistema inmunológico del hospedador. Por ejemplo, estudios en poliovirus demuestran que disminuyendo la tasa de mutación mediante polimerasas de alta fidelidad, replican a la misma velocidad que los poliovirus *wild type* pero generan menor diversidad genética, lo que les impide adaptarse a condiciones de crecimiento

adversas (Vignuzzi y col. 2006; Pfeiffer y Kirkegaard 2005). Se ha visto también que incrementando la fidelidad replicativa en virus de RNA, el tropismo de los virus hacia sus tejidos diana disminuye de forma significativa, además de reducir la patogenicidad (Vignuzzi y col. 2008). Aún así, las tasas de mutación de los virus que infectan bacterias también son muy elevadas, como por ejemplo en los bacteriófagos utilizados, por lo que otras presiones de selección deben estar actuando. Por otro lado, los rápidos ciclos de infección de los virus les llevan a alcanzar altos títulos antes de que los mecanismos de defensa del hospedador puedan actuar (Coffin 1995), lo que significa que en el caso de los virus de RNA, el coste de las funciones de corrección de error en términos de tasas de replicación podrían ser excesivas para este tipo de virus (Furió y col. 2005).

Dado que la mayoría de las mutaciones son deletéreas, existe una presión de selección que reduce la tasa de mutación, y la idea de que las tasas de mutación tan elevadas de los virus de RNA deben mantenerse por la rápida capacidad de adaptación que les confieren abunda en la literatura (Holland y col. 1982; Elena y Sanjuán 2005; Domingo 2006; Vignuzzi y col. 2006). No obstante, esta reducción podría tener límites impuestos por restricciones bioquímicas, ya que los mecanismos de fidelidad de replicación pueden acarrear costes cinéticos y energéticos y ser seleccionados en contra (Kimura 1967; Dawson 1998). En cualquier caso, las altas tasas de mutación de los virus de RNA implican que las mutaciones beneficiosas van a aparecer antes, aunque por esa misma razón, la cantidad de mutaciones deletéreas que van a acumular va a ser mayor, lo que podría retrasar la adaptación en algunos casos. De hecho, las diferencias encontradas entre estos dos tipos de virus no se pueden explicar solamente con las diferencias en las tasas de mutación. La tasa de adaptación resulta solamente en un incremento medio entre 1.5 y 5 veces en virus de ssRNA en comparación con los de ssDNA, mientras que las diferencias en las tasas de mutación son mucho mayores, alrededor de 100 veces más. Los valores de la distribución de los efectos mutacionales permiten predecir, mediante ciertas asunciones, las tasas óptimas de mutación de los virus (Orr 2000; Johnson y Barton 2002). Con los resultados que hemos obtenido junto a otros trabajos previos, (Kunkel 1985; Sanjuán y col. 2004b; Furió y col. 2005; Carrasco y col. 2007; Peris y col. 2010;

Tromas y Elena 2010), es posible generalizar que los virus de DNA presentan tasas por debajo de los valores óptimos, al menos, según predice la teoría. Las predicciones de U_{opt} van desde 0.20 a 0.49 s/g/c en los virus de ssRNA (VSV, TEV, Q β), y de 0.07 a 0.13 s/g/c en los virus de ssDNA (f1 y Φ X174). Mientras que las tasas de mutación de los virus de ssDNA son alrededor de 20 veces menores que sus valores óptimos, en el caso de los virus de RNA, las tasas son próximas a la optimización (tabla 8). Por tanto, parece que los virus de RNA presentan tasas de mutación próximas a sus óptimos, mientras que las de los virus de DNA parecen ser subóptimas. El hecho de que los virus de ssDNA tengan tasas subóptimas está apoyado además por la no adaptación de dos de los tres linajes de f1 en la recuperación de eficacia tras los 50 pases, a pesar de que estudios previos han estimado que al menos el 2% de las sustituciones nucleotídicas son beneficiosas para este virus en este mismo ambiente (Peris y col. 2010). Una posible explicación para que las tasas de mutación de los virus de ssDNA sean subóptimas, es que como se ha comentado, utilizan las polimerasas del hospedador para su replicación que, obviamente, no pueden modificar. Cabe recordar no obstante, que los virus de ssDNA

Tabla 8. Tasas de mutación empíricas y las óptimas predichas para algunos virus de ssRNA y ssDNA.

Material genético	Especie	Tamaño genómico	U^a	Referencias	U_{opt}^b	Referencias
ssRNA	Q β	4198	0.5-1.0	Tesis (Sanjuán y col. 2009)	0.20-0.31	Tesis
	TEV	9494	0.05-0.28	(Tromas y Elena 2010)	0.24-0.29	(Carrasco y col. 2007)
	VSV	11161	0.20-0.77	(Drake 1993) (Furió y col. 2005)	0.38-0.49	(Sanjuán y col. 2004b)
ssDNA	Φ X174	5386	0.005-0.007	(Raney y col. 2004) (Cuevas y col. 2009a)	0.08-0.13	Tesis
	f1/m13	6407	0.005	(Kunkel 1985)	0.07-0.11	(Peris y col. 2010)

^a Medido como sustituciones por genoma por célula infectada.

^b Calculado como la media armónica de los coeficientes de selección contra las mutaciones deletéreas (Orr 2000). Los coeficientes de selección de las sustituciones nucleotídicas simples fueron obtenidos a partir de las referencias indicadas y expresados como $s = r_i/r_0 - 1$, donde r_i/r_0 es el ratio de la tasa de crecimiento del mutante i relativo al genotipo de referencia (Sanjuán 2010).

presentan tasas de mutación más elevadas que las de sus hospedadores (Drake y col. 1998), por lo que los virus de ssDNA son capaces de incrementar la tasa de mutación respecto a la tasa de su hospedador, aún usando las mismas polimerasas. Esto puede lograrse, por ejemplo, escapando de los sistemas de reparación del DNA. De hecho, una estrategia de Φ X174 para aumentar su tasa de mutación es eliminar motivos GATC en su secuencia (Cuevas y col. 2011) ya que la presencia de estos motivos es necesaria para el funcionamiento del sistema de corrección de errores mediado por metilación, el principal mecanismo de fidelidad post-replicativa en *E.coli*. (Lu y col. 1983; Modrich y Lahue 1996; Marti y col. 2002; Friedberg 2003).

Para comprobar empíricamente si Φ X174 presenta tasas de mutación subóptimas, ha sido sometido a pases de evolución en presencia del mutágeno 5-FU. En virus de RNA, donde pensamos que la tasa de mutación podría estar optimizada, se ha demostrado que la adición de mutágenos puede llevar a la extinción viral (Loeb y col. 1999; Sierra y col. 2000; Grande-Pérez y col. 2002; Grande-Pérez y col. 2005), pero poco se sabe acerca de cómo afectan a estos virus de DNA. No esperamos un resultado parecido al obtenido con virus de RNA ya que las tasas de mutación basales de los virus de DNA son menores y deben estar más lejos de sus umbrales de extinción. En nuestro experimento, poblaciones en las que hemos incrementado la tasa de mutación un orden de magnitud (aproximándonos así a la tasa óptima calculada) se han adaptado de forma específica a las nuevas condiciones, pero no han incrementado su capacidad adaptativa en general. El resultado obtenido no es muy concluyente, ya que desconocemos si la aparición de resistencia a este compuesto puede conllevar un coste en términos de eficacia en ausencia del mismo, restringiendo así la adaptabilidad del virus. El 5-FU modifica la fisiología del hospedador y crea un nuevo ambiente celular al que el virus se ha adaptado y, tal y como se ha demostrado en otros virus, esto puede acarrear un coste en el ambiente original (Turner y Elena 2000; Cuevas y col. 2003; Lázaro y col. 2003; Duffy y col. 2006; Duffy y col. 2007).

CONCLUSIONES FINALES

- Las seis especies virales utilizadas, Φ X174, G4, f1, Q β , SP y MS2 (tres bacteriófagos de ssDNA y tres de ssRNA respectivamente), son capaces de adaptarse a la misma cepa hospedadora y a las mismas condiciones de laboratorio, por lo que es posible comparar directamente su comportamiento evolutivo.
- Tras los experimentos de acumulación de mutaciones, no existen diferencias significativas en términos de robustez genética entre los virus de ssDNA y ssRNA analizados. Este hecho queda corroborado por los resultados obtenidos mediante mutagénesis dirigida, en los que se observa que los efectos mutacionales son similares en Φ X174 y Q β .
- Aunque los efectos mutacionales aleatorios son globalmente similares en virus de ssDNA y ssRNA, sí que existen diferencias significativas atendiendo a los efectos que producen las mutaciones sinónimas, ya que presentan efectos más frecuentemente deletéreos en los de ssRNA, debido, en parte, a la complejidad de las estructuras secundarias de estos genomas.
- En los experimentos de recuperación de eficacia se observa una tasa de adaptación significativamente superior para las especies de ssRNA a corto plazo. Este hecho puede ser explicado, en parte, por las altas tasas de mutación de los virus de RNA, sin embargo, las diferencias encontradas en términos de adaptabilidad y tasa de evolución molecular son menores de lo esperado por las diferencias entre tasas de mutación.

- Durante la fase de recuperación de eficacia tuvieron lugar cambios convergentes en linajes independientes. Lo mismo ocurrió en el experimento de adaptación a un mutágeno, en el que también se observó evolución paralela. Ello indica el alto grado de restricción evolutiva de los bacteriófagos de ssRNA y ssDNA utilizados.
- Las tasas de mutación de los virus de ssRNA parecen ser óptimas o estar próximas a sus valores óptimos, mientras que en el caso de los virus de ssDNA las tasas de mutación parecen estar por debajo de los valores que maximizan la adaptación a nuevos ambientes.
- El bacteriófago $\Phi X174$ es capaz de adaptarse a condiciones de alta tasa de mutación impuesta por la presencia de un agente mutágeno, el 5-FU, aunque la adaptación presenta un compromiso y genera costes asociados en el crecimiento en ausencia de la droga.

BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo-Romero, P., F. de la Iglesia, y S. F. Elena. 2008. The pleiotropic cost of host-specialization in *Tobacco etch potyvirus*. *Infect. Genet. Evol.* 8:806-814.
- Ahlquist, P. 2006. Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:371-382.
- Anderson, J. P., R. Daifuku, y L. A. Loeb. 2004. Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:183-205.
- Arjan, J. A., M. Visser, C. W. Zeyl, P. J. Gerrish, J. L. Blanchard, y R. E. Lenski. 1999. Diminishing returns from mutation supply rate in asexual populations. *Science* 283:404-406.
- Arribas, M., L. Cabanillas, y E. Lázaro. 2011. Identification of mutations conferring 5-azacytidine resistance in bacteriophage Q β . *Virology* 417:343-352.
- Auer, R., y J. C. Bell. 2012. Oncolytic viruses: smart therapeutics for smart cancers. *Future Oncol.* 8:1-4.
- Barany, F., y J. D. Boeke. 1983. Genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae* by DNA cloned into the single-stranded bacteriophage f1. *J. Bacteriol.* 153:200-210.
- Beekwilder, J., R. Nieuwenhuizen, R. Poot, y J. van Duin. 1996. Secondary structure model for the first three domains of Q β RNA. Control of A-protein synthesis. *J. Mol. Biol.* 256:8-19.
- Beekwilder, M. J., R. Nieuwenhuizen, y J. van Duin. 1995. Secondary structure model for the last two domains of single-stranded RNA phage Q β . *J. Mol. Biol.* 247:903-917.
- Bell, G. (1997). *Selection, the Mechanism of Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Belshaw, R., A. Gardner, A. Rambaut, y O. G. Pybus. 2008. Pacing a small cage: mutation y RNA viruses. *Trends Ecol. Evol.* 23:188-193.
- Belshaw, R., O. G. Pybus, y A. Rambaut. 2007. The evolution of genome compression and genomic novelty in RNA viruses. *Genome Res.* 17:1496-1504.
- Berg, O. G., y P. J. Silva. 1997. Codon bias in *Escherichia coli*: the influence of codon context on mutation and selection. *Nucleic Acids Res.* 25:1397-1404.
- Bergstrom, C. T., y J. Pritchard. 1998. Germline bottlenecks and the evolutionary maintenance of mitochondrial genomes. *Genetics* 149:2135-2146.

- Betancourt, A. J. 2009. Genomewide patterns of substitution in adaptively evolving populations of the RNA bacteriophage MS2. *Genetics* 181:1535-1544.
- Buckling, A., M. R. Craig, M. A. Brockhurst, y N. Colegrave. 2009. The Beagle in a bottle. *Nature* 457:824-829.
- Bull, J. J., M. R. Badgett, H. A. Wichman, J. P. Huelsenbeck, D. M. Hillis, A. Gulati, C. Ho, y I. J. Molineux. 1997. Exceptional convergent evolution in a virus. *Genetics* 147:1497-1507.
- Bull, J. J., R. Sanjuán, y C. O. Wilke. 2007. Theory of lethal mutagenesis for viruses. *J. Virol.* 81:2930-2939.
- Burch, C. L., y L. Chao. 1999. Evolution by small steps and rugged landscapes in the RNA virus phi6. *Genetics* 151:921-927.
- Burch, C. L., y L. Chao. 2004. Epistasis and its relationship to canalization in the RNA virus $\Phi 6$. *Genetics* 167:559-567.
- Butcher, D. 1995. Muller's ratchet, epistasis and mutation effects. *Genetics* 141:431-437.
- Calendar, R. (2006). *The bacteriophages*. Oxford University Press.
- Carrasco, P., F. de la Iglesia, y S. F. Elena. 2007. Distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in *Tobacco etch virus*. *J. Virol.* 81:12979-12984.
- Chamary, J. V., J. L. Parmley, y L. D. Hurst. 2006. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat. Rev. Genet.* 7:98-108.
- Chao, L., C. U. Rang, y L. E. Wong. 2002. Distribution of spontaneous mutants and inferences about the replication mode of the RNA bacteriophage $\Phi 6$. *J. Virol.* 76:3276-3281.
- Charrel, R. N., P. de Micco, y L. de, X. 1999. Phylogenetic analysis of GB viruses A and C: evidence for cospeciation between virus isolates and their primate hosts. *J. Gen. Virol.* 80:2329-2335.
- Chen, M., A. Uchiyama, y B. A. Fane. 2007. Eliminating the requirement of an essential gene product in an already very small virus: scaffolding protein B-free $\Phi X174$, B-free. *J. Mol. Biol.* 373:308-314.

- Chen, N. G., Y. A. Yu, Q. Zhang, y A. A. Szalay. 2011. Replication efficiency of oncolytic vaccinia virus in cell cultures prognosticates the virulence and antitumor efficacy in mice. *J. Transl. Med.* 9:164.
- Coffin, J. M. 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267:483-489.
- Crill, W. D., H. A. Wichman, y J. J. Bull. 2000. Evolutionary reversals during viral adaptation to alternating hosts. *Genetics* 154:27-37.
- Crotty, S., C. E. Cameron, y R. Andino. 2001. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6895-6900.
- Crow, J. F., y M. Kimura. 1965. Evolution in sexual and asexual populations. *Am. Nat.* 99:439-450.
- Crow, K. D., y G. P. Wagner. 2006. Proceedings of the SMC Tri-National Young Investigators' Workshop 2005. What is the role of genome duplication in the evolution of complexity and diversity? *Mol. Biol. Evol.* 23:887-892.
- Cuevas, J. M., S. Duffy, y R. Sanjuán. 2009a. Point mutation rate of bacteriophage Φ X174. *Genetics* 183:747-749.
- Cuevas, J. M., S. F. Elena, y A. Moya. 2002. Molecular basis of adaptive convergence in experimental populations of RNA viruses. *Genetics* 162:533-542.
- Cuevas, J. M., A. Moya, y S. F. Elena. 2003. Evolution of RNA virus in spatially structured heterogeneous environments. *J. Evol. Biol.* 16:456-466.
- Cuevas, J. M., A. Moya, y R. Sanjuán. 2009b. A genetic background with low mutational robustness is associated with increased adaptability to a novel host in an RNA virus. *J. Evol. Biol.* 22:2041-2048.
- Cuevas, J. M., M. Pereira-Gómez, y R. Sanjuán. 2011. Mutation rate of bacteriophage Φ X174 modified through changes in GATC sequence context. *Infect. Genet. Evol.* 11:1820-1822.
- Cunningham, C. W., K. Jeng, J. Husti, M. Badgett, I. J. Molineux, D. M. Hillis, y J. J. Bull. 1997. Parallel molecular evolution of deletions and nonsense mutations in bacteriophage T7. *Mol. Biol. Evol.* 14:113-116.
- Dawson, K. J. 1998. Evolutionarily stable mutation rates. *J. Theor. Biol.* 194:143-157.
- de Paepe, M., y F. Taddei. 2006. Viruses' life history: towards a mechanistic basis of a trade-off between survival and reproduction among phages. *PLoS Biol.* 4:e193.

de Visser, J. A., J. Hermisson, G. P. Wagner, M. L. Ancel, H. Bagheri-Chaichian, J. L. Blanchard, L. Chao, J. M. Cheverud, S. F. Elena, W. Fontana, G. Gibson, T. F. Hansen, D. Krakauer, R. C. Lewontin, C. Ofria, S. H. Rice, G. von Dassow, A. Wagner, y M. C. Whitlock. 2003. Perspective: Evolution and detection of genetic robustness. *Evolution* 57:1959-1972.

Domingo, E. (2006). *Quasispecies: concept and implications for virology*. Springer.

Domingo, E. 1997. Rapid evolution of viral RNA genomes. *J. Nutr.* 127:958S-961S.

Domingo, E., C. Escarmís, E. Lázaro, y S. C. Manrubia. 2005. Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Res.* 107:129-139.

Domingo, E., R. A. Flavell, y C. Weissmann. 1976. In vitro site-directed mutagenesis: generation and properties of an infectious extracistronic mutant of bacteriophage Qbeta. *Gene* 1:3-25.

Domingo, E., y J. J. Holland. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:151-178.

Domingo-Calap, P., M. Pereira-Gómez, y R. Sanjuán. 2010. Selection for thermostability can lead to the emergence of mutational robustness in an RNA virus. *J. Evol. Biol.* 23:2453-2460.

Drake, J. W. 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7160-7164.

Drake, J. W. 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4171-4175.

Drake, J. W. 2007. Too many mutants with multiple mutations. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42:247-258.

Drake, J. W., B. Charlesworth, D. Charlesworth, y J. F. Crow. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148:1667-1686.

Drake, J. W., y J. J. Holland. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13910-13913.

Drummond, A., O. G. Pybus, y A. Rambaut. 2003. Inference of viral evolutionary rates from molecular sequences. *Adv. Parasitol.* 54:331-358.

Duffy, S., C. L. Burch, y P. E. Turner. 2007. Evolution of host specificity drives reproductive isolation among RNA viruses. *Evolution* 61:2614-2622.

- Duffy, S., y E. C. Holmes. 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *J. Virol.* 82:957-965.
- Duffy, S., L. A. Shackelton, y E. C. Holmes. 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* 9:267-276.
- Duffy, S., P. E. Turner, y C. L. Burch. 2006. Pleiotropic costs of niche expansion in the RNA bacteriophage $\Phi 6$. *Genetics* 172:751-757.
- Eigen, M., J. McCaskill, y P. Schuster. 1988. Molecular quasi-species. *J. Phys. Chem.* 92:6881-6891.
- Ekechukwu, M. C., D. J. Oberste, y B. A. Fane. 1995. Host and $\Phi X174$ mutations affecting the morphogenesis or stabilization of the 50S complex, a single-stranded DNA synthesizing intermediate. *Genetics* 140:1167-1174.
- Elena, S. F., P. Carrasco, J. A. Darós, y R. Sanjuán. 2006. Mechanisms of genetic robustness in RNA viruses. *EMBO Rep.* 7:168-173.
- Elena, S. F., M. Dávila, I. S. Novella, J. J. Holland, E. Domingo, y A. Moya. 1998. Evolutionary dynamics of fitness recovery from the debilitating effects of Muller's ratchet. *Evolution* 52:309-314.
- Elena, S. F., y R. E. Lenski. 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Genet.* 4:457-469.
- Elena, S. F., y R. Sanjuán. 2005. RNA viruses as complex adaptive systems. *Biosystems* 81:31-41.
- Elena, S. F., and R. Sanjuán. 2005. On the adaptive value of high mutation rates in RNA viruses: separating causes from consequences. *J. Virol.* 79:11555-11558.
- Eyre-Walker, A., y P. D. Keightley. 2007. The distribution of fitness effects of new mutations. *Nat. Rev. Genet.* 8:610-618.
- Eyre-Walker, A., M. Woolfit, y T. Phelps. 2006. The distribution of fitness effects of new deleterious amino acid mutations in humans. *Genetics* 173:891-900.
- Ferguson, M. S., N. R. Lemoine, y Y. Wang. 2012. Systemic delivery of oncolytic viruses: hopes and hurdles. *Adv. Virol.* 2012:805629.
- Firth, C., A. Kitchen, B. Shapiro, M. A. Suchard, E. C. Holmes, y A. Rambaut. 2010. Using time-structured data to estimate evolutionary rates of double-stranded DNA viruses. *Mol. Biol. Evol.* 27:2038-2051.

Fisher, R.A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford University Press, Oxford.

Flint, J.S., Enquist, L.W., Racaniello, V., y Shalka A.M. (2004). *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses*. ASM PRESS, Washington DC.

Frank, S. A. 2007. Maladaptation and the paradox of robustness in evolution. *PLoS ONE* 2:e1021.

Friedberg, E. C. 2003. DNA damage and repair. *Nature* 421:436-440.

Furió, V., A. Moya, y R. Sanjuán. 2005. The cost of replication fidelity in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:10233-10237.

García-Díaz, M., y K. Bebenek. 2007. Multiple functions of DNA polymerases. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 26:105-122.

Gerrish, P. J., y R. E. Lenski. 1998. The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* 102-103:127-144.

Graci, J. D., K. Too, E. D. Smidansky, J. P. Edathil, E. W. Barr, D. A. Harki, J. E. Galarraga, J. M. Bollinger, Jr. B. R. Peterson, D. Loakes, D. M. Brown, y C. E. Cameron. 2008. Lethal mutagenesis of picornaviruses with N-6-modified purine nucleoside analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:971-979.

Grande-Pérez, A., E. Lázaro, P. Lowenstein, E. Domingo, y S. C. Manrubia. 2005. Suppression of viral infectivity through lethal defection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:4448-4452.

Grande-Pérez, A., S. Sierra, M. G. Castro, E. Domingo, y P. R. Lowenstein. 2002. Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12938-12943.

Groeneveld, H., K. Thimon, y J. van Duin. 1995. Translational control of maturation-protein synthesis in phage MS2: a role for the kinetics of RNA folding? *RNA* 1:79-88.

Haigh, J. 1978. The accumulation of deleterious genes in a population-Muller's Ratchet. *Theor. Popul. Biol.* 14:251-267.

Haldane, J. B. S. 1927. A mathematical theory of natural and artificial selection. *Proc. Camb. Phil. Soc.* 23:838-844.

- Haldane, J. B. S. 1937. The effect of variation on fitness. *Am. Nat.* 71:337-349.
- Hanada, K., Y. Suzuki, y T. Gojobori. 2004. A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol. Biol. Evol.* 21:1074-1080.
- Harrison, B., y D. Robinson. 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses). *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:369-398.
- Hino, S., y H. Miyata. 2007. Torque teno virus (TTV): current status. *Rev. Med. Virol.* 17:45-57.
- Holland, J. J., K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol, y S. VandePol. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215:1577-1585.
- Holmes, E. C. 2003. Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends Microbiol.* 11:543-546.
- Holmes, E. C. 2008. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 62:307-328.
- Holmes, E.C. (2009). *The evolution and emergence of RNA viruses*. Oxford University Press.
- Horn, E. E., y R. M. Herriott. 1962. The mutagenic action of nitrous acid on "single-stranded" (denatured) Hemophilus transforming DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:1409-1416.
- Hughes, A. L., y R. Friedman. 2000. Evolutionary diversification of protein-coding genes of hantaviruses. *Mol. Biol. Evol.* 17:1558-1568.
- Jenkins, G. M., A. Rambaut, O. G. Pybus, y E. C. Holmes. 2002. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J. Mol. Evol.* 54:156-165.
- Johnson, T., y N. H. Barton. 2002. The effect of deleterious alleles on adaptation in asexual populations. *Genetics* 162:395-411.
- Jordan, I., S. Northoff, M. Thiele, S. Hartmann, D. Horn, K. Hoving, H. Bernhardt, S. Oehmke, H. von Horsten, D. Rebeski, L. Hinrichsen, V. Zelnik, W. Mueller, y V. Sandig. 2011. A chemically defined production process for highly attenuated poxviruses. *Biologicals* 39:50-58.

Kan, S., Y. Wang, L. Sun, P. Jia, Y. Qi, J. Su, L. Liu, G. Yang, L. Liu, Z. Wang, J. Wang, G. Liu, N. Jin, X. Li, y Z. Ding. 2012. Attenuation of vaccinia tian tan strain by removal of viral TC7L-TK2L and TA35R genes. PLoS ONE 7:e31979.

Keightley, P. D. 2004. Comparing analysis methods for mutation-accumulation data. Genetics 167:551-553.

Kimura, M. 1967. On the evolutionary adjustment of spontaneous mutation rates. Genet. Res. 9:23-34.

Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. Nature 217:624-626.

Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.

Kimura, M. 1985. The neutral theory of molecular evolution. New Scientist 11:41-46.

Klovins, J., V. Berzins, y J. van Duin. 1998. A long-range interaction in Q β RNA that bridges the thousand nucleotides between the M-site and the 3' end is required for replication. RNA 4:948-957.

Klovins, J., N. A. Tsareva, M. H. de Smit, V. Berzins, y J. van Duin. 1997. Rapid evolution of translational control mechanisms in RNA genomes. J. Mol. Biol. 265:372-384.

Krakauer, D. C. 2000. Stability and evolution of overlapping genes. Evolution 54:731-739.

Krakauer, D. C., y J. B. Plotkin. 2002. Redundancy, antiredundancy, and the robustness of genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:1405-1409.

Kryazhimskiy, S., G. A. Bazykin, y J. Dushoff. 2008. Natural selection for nucleotide usage at synonymous and nonsynonymous sites in influenza A virus genes. J. Virol. 82:4938-4945.

Kryazhimskiy, S., y J. B. Plotkin. 2008. The population genetics of dN/dS. PLoS Genet. 4:e1000304.

Kudla, G., A. W. Murray, D. Tollervey, y J. B. Plotkin. 2009. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. Science 324:255-258.

Kunkel, T. A. 1985. The mutational specificity of DNA polymerase-beta during in vitro DNA synthesis. Production of frameshift, base substitution, and deletion mutations. J. Biol. Chem. 260:5787-5796.

- Lázaro, E., C. Escarmís, J. Pérez-Mercader, S. C. Manrubia, y E. Domingo. 2003. Resistance of virus to extinction on bottleneck passages: study of a decaying and fluctuating pattern of fitness loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10830-10835.
- Lemey, P., O. G. Pybus, S. Van Dooren, y A. M. Vandamme. 2005. A Bayesian statistical analysis of human T-cell lymphotropic virus evolutionary rates. *Infect. Genet. Evol.* 5:291-298.
- Lenski, R. E., J. E. Barrick, y C. Ofria. 2006. Balancing robustness and evolvability. *PLoS Biol.* 4:e428.
- Lenski, R. E., C. Ofria, T. C. Collier, y C. Adami. 1999. Genome complexity, robustness and genetic interactions in digital organisms. *Nature* 400:661-664.
- Lenski, R. E., M. R. Rose, S. C. Simpson, y S. C. Tadler. 1991. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2000 generations. *Am. Nat.* 138:1315-1341.
- Loeb, L. A., J. M. Essigmann, F. Kazazi, J. Zhang, K. D. Rose, y J. I. Mullins. 1999. Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1492-1497.
- Lu, P., S. Cheung, y K. Arndt. 1983. Possible molecular detent in the DNA structure at regulatory sequences. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1:509-521.
- Lucas, M., U. Karrer, A. Lucas, and P. Klenerman. 2001. Viral escape mechanisms-escapology taught by viruses. *Int. J. Exp. Pathol.* 82:269-286.
- Luria, S. E. 1951. The frequency distribution of spontaneous bacteriophage mutants as evidence for the exponential rate of phage reproduction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 16:463-470.
- Luria, S. E., y M. Delbrück. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28:491-511.
- Lynch, M., R. Bürger, D. Butcher, y W. Gabriel. 1993. The mutational meltdown in asexual populations. *J. Heredity* 84:339-344.
- MacLean, R. C., y G. Bell. 2003. Divergent evolution during an experimental adaptive radiation. *Proc. Biol. Sci.* 270:1645-1650.
- Marti, T. M., C. Kunz, y O. Fleck. 2002. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J. Cell Physiol.* 191:28-41.

Martínez-Picado, J., M. P. dePasquale, N. Kartsonis, G. J. Hanna, J. Wong, D. Finzi, E. Rosenberg, H. F. Günthard, L. Sutton, A. Savara, C. J. Petropoulos, N. Hellmann, B. D. Walker, D. D. Richman, R. F. Siciliano, y R. T. D'Aquila. 2000. Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10948-10953.

Miralles, R., A. Moya, and S. F. Elena. 2000. Diminishing returns of population size in the rate of RNA virus adaptation. *J. Virol.* 74:3566-3571.

Modrich, P., y R. Lahue. 1996. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 65:101-133.

Moir, D., J. Mao, J. W. Schumm, G. F. Vovis, B. L. Alford, y A. Taunton-Rigby. 1982. Molecular cloning and characterization of double-stranded cDNA coding for bovine chymosin. *Gene* 19:127-138.

Moore, F. B., D. E. Rozen, y R. E. Lenski. 2000. Pervasive compensatory adaptation in *Escherichia coli*. *Proc. Biol. Sci.* 267:515-522.

Mukai, T. 1964. The genetic structure of natural populations of *Drosophila melanogaster*. I. Spontaneous mutation rate of polygenes controlling viability. *Genetics* 50:1-19.

Muller, H. J. 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mut. Res.* 1:2-9.

Ngandu, N. K., K. Scheffler, P. Moore, Z. Woodman, D. Martin, y C. Seoighe. 2008. Extensive purifying selection acting on synonymous sites in HIV-1 Group M sequences. *J. Virol.* 5:160.

Nguyen, A. H., I. J. Molineux, R. Springman, y J. J. Bull. 2012. Multiple genetic pathways to similar fitness limits during viral adaptation to a new host. *Evolution* 66:363-374.

Novella, I. S. 2003. Contributions of vesicular stomatitis virus to the understanding of RNA virus evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:399-405.

Novella, I. S., E. A. Duarte, S. F. Elena, A. Moya, E. Domingo, y J. J. Holland. 1995. Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5841-5844.

Ohta, T. 1992. The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23:263-286.

Olsthoorn, R. C., y J. van Duin. 1996. Evolutionary reconstruction of a hairpin deleted from the genome of an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12256-12261.

Orr, H. A. 1998. The population genetics of adaptation: the distribution of factors fixed during adaptive evolution. *Evolution* 52:935-949.

Orr, H. A. 2000. The rate of adaptation in asexuals. *Genetics* 155:961-968.

Parato, K. A., C. J. Breitbach, F. Le Boeuf, J. Wang, C. Storbeck, C. Ilkow, J. S. Diallo, T. Falls, J. Burns, V. García, F. Kanji, L. Evgin, K. Hu, F. Paradis, S. Knowles, T. H. Hwang, B. C. Vanderhyden, R. Auer, D. H. Kim, y J. C. Bell. 2011. The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Mol. Ther.* 20:749-58.

Pathak, V. K., y H. M. Temin. 1992. 5-Azacytidine and RNA secondary structure increase the retrovirus mutation rate. *J. Virol.* 66:3093-3100.

Peck, J. R. 1994. A ruby in the rubbish: beneficial mutations, deleterious mutations and the evolution of sex. *Genetics* 137:597-606.

Peck, J. R., G. Barreau, y S. C. Heath. 1997. Imperfect genes, Fisherian mutation and the evolution of sex. *Genetics* 145:1171-1199.

Peris, J. B., P. Davis, J. M. Cuevas, M. R. Nebot, y R. Sanjuán. 2010. Distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in a DNA virus. *Genetics* 185:603-609.

Pfeiffer, J. K., y K. Kirkegaard. 2005. Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog.* 1:e11.

Plyusnin, A., y S. P. Morzunov. 2001. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 256:47-75.

Pond, S. L., B. Murrell, y A. F. Poon. 2012. Evolution of viral genomes: interplay between selection, recombination, and other forces. *Methods Mol. Biol.* 856:239-272.

Prusoff, W. H., T. S. Lin, E. M. August, T. G. Wood, y M. E. Marongiu. 1989. Approaches to antiviral drug development. *Yale J. Biol. Med.* 62:215-225.

Qian, W., B. Y. Liao, A. Y. Chang, y J. Zhang. 2010. Maintenance of duplicate genes and their functional redundancy by reduced expression. *Trends Genet.* 26:425-430.

Raney, J. L., R. R. DeLongchamp, y C. R. Valentine. 2004. Spontaneous mutant frequency and mutation spectrum for gene A of Φ X174 grown in *E. coli*. *Environ. Mol. Mutagen.* 44:119-127.

Remold, S. K., A. Rambaut, y P. E. Turner. 2008. Evolutionary genomics of host adaptation in vesicular stomatitis virus. *Mol. Biol. Evol.* 25:1138-1147.

Rico, P., P. Ivars, S. F. Elena, y C. Hernández. 2006. Insights into the selective pressures restricting Pelargonium flower break virus genome variability: Evidence for host adaptation. *J. Virol.* 80:8124-8132.

Salemi, M., M. Lewis, J. F. Egan, W. W. Hall, J. Desmyter, and A. M. Vandamme. 1999. Different population dynamics of human T cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users compared with endemically infected tribes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13253-13258.

Sanger, F., G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, C. A. Hutchison, P. M. Slocombe, M. Smith. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage Φ X174 DNA. *Nature* 265:687-695.

Sanjuán, R. 2010. Mutational fitness effects in RNA and ssDNA viruses: common patterns revealed by site-directed mutagenesis studies. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 365:1975-1982.

Sanjuán, R. 2012. From molecular genetics to phylodynamics: evolutionary relevance of mutation rates across viruses. *PLoS Pathogens* 8:e1002685.

Sanjuán, R., P. Agudelo-Romero, y S. F. Elena. 2009. Upper-limit mutation rate estimation for a plant RNA virus. *Biol. Lett.* 5:394-396.

Sanjuán, R., J. M. Cuevas, V. Furió, E. C. Holmes, y A. Moya. 2007. Selection for robustness in mutagenized RNA viruses. *PLoS Genet.* 3:e93.

Sanjuán, R. y Domingo-Calap, P. (2011). *Encyclopedia of Life Sciences*.

Sanjuán, R., A. Moya, y S. F. Elena. 2004a. The contribution of epistasis to the architecture of fitness in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:15376-15379.

Sanjuán, R., A. Moya, y S. F. Elena. 2004b. The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:8396-8401.

Sanjuán, R., M. R. Nebot, N. Chirico, L. M. Mansky, y R. Belshaw. 2010. Viral mutation rates. *J. Virol.* 84:9733-9748.

Sardanyes, J., F. Martínez, J. A. Darós, y S. F. Elena. 2012. Dynamics of alternative modes of RNA replication for positive-sense RNA viruses. *J. R. Soc. Interface.* 9:768-776.

- Sarrazin, C., C. Hezode, S. Zeuzem, y J. M. Pawlotsky. 2012. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 56 Suppl:S88-S100.
- Schinazi, R. F., y W. H. Prusoff. 1981. Antiviral drugs: modes of action and strategies for therapy. *Hosp. Pract. (Off Ed)*. 16:113-124.
- Schultz, S. T., y M. Lynch. 1997. Mutation and extinction: the role of variable mutational effects, synergistic epistasis, beneficial mutations, and degree of outcrossing. *Evolution* 51:1363-1371.
- Schuster, P., y J. Swetina. 1988. Stationary mutant distributions and evolutionary optimization. *Bull. Math. Biol.* 50:635-660.
- Shackelton, L. A., y E. C. Holmes. 2006. Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human B19 erythrovirus. *J. Virol.* 80:3666-3669.
- Shackelton, L. A., C. R. Parrish, U. Truyen, y E. C. Holmes. 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:379-384.
- Shields, D. C., P. M. Sharp, D. G. Higgins, y F. Wright. 1988. "Silent" sites in *Drosophila* genes are not neutral: evidence of selection among synonymous codons. *Mol. Biol. Evol.* 5:704-716.
- Sierra, S., M. Dávila, P. R. Lowenstein, y E. Domingo. 2000. Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load y fitness in loss of infectivity. *J. Virol.* 74:8316-8323.
- Skripkin, E. A., M. R. Adhin, M. H. de Smit, y J. van Duin. 1990. Secondary structure of the central region of bacteriophage MS2 RNA. Conservation and biological significance. *J. Mol. Biol.* 211:447-463.
- Skripkin, E. A., y A. B. Jacobson. 1993. A two-dimensional model at the nucleotide level for the central hairpin of coliphage Q β RNA. *J. Mol. Biol.* 233:245-260.
- Sniegowski, P. D., P. J. Gerrish, T. Johnson, y A. Shaver. 2000. The evolution of mutation rates: separating causes from consequences. *BioEssays* 22:1057-1066.
- Springman, R., T. Keller, I. Molineux, y J. J. Bull. 2009. Evolution at a high imposed mutation rate: adaptation obscures the load in phage T7. *Genetics* 184:221-232.
- Steinhauer, D. A., E. Domingo, y J. J. Holland. 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 122:281-288.

- Switzer, W. M., M. Salemi, V. Shanmugam, F. Gao, M. E. Cong, C. Kuiken, V. Bhullar, B. E. Beer, D. Vallet, A. Gautier-Hion, Z. Tooze, F. Villinger, E. C. Holmes, and W. Heneine. 2005. Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. *Nature* 434:376-380.
- Taddei, F., M. Radman, J. Maynard-Smith, B. Toupance, P. H. Gouyon, y B. Godelle. 1997. Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* 387:700-702.
- Tessman, E. S., y P. K. Peterson. 1976. Bacterial rep- mutations that block development of small DNA bacteriophages late in infection. *J. Virol.* 20:400-412.
- Travisano, M., J. A. Mongold, A. F. Bennet, y R. E. Lenski. 1995. Experimental tests of the role of adaptation, chance, and history in evolution. *Science* 267:87-90.
- Tromas, N., y S. F. Elena. 2010. The rate and spectrum of spontaneous mutations in a plant RNA virus. *Genetics* 185:983-989.
- Turner, P. E., y S. F. Elena. 2000. Cost of host radiation in an RNA virus. *Genetics* 156:1465-1470.
- Umemura, T., Y. Tanaka, K. Kiyosawa, H. J. Alter, y J. W. Shih. 2002. Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus 1). *FEBS Lett.* 510:171-174.
- Vandamme, A. M., U. Bertazzoni, y M. Salemi. 2000. Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II. *Gene* 261:171-180.
- van der Noordaa J., F. Dekking, J. Posthuma, y B. J. Beunders. 1967. Primary vaccination with an attenuated strain of vaccinia virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 22:210-214.
- Vella, S., y L. Palmisano. 2005. The global status of resistance to antiretroviral drugs. *Clin. Infect. Dis.* 41 Suppl. 4:S239-S246.
- Vignuzzi, M., J. K. Stone, J. J. Arnold, C. E. Cameron, y R. Andino. 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439:344-348.
- Vignuzzi, M., E. Wendt, y R. Andino. 2008. Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity. *Nat. Med.* 14:154-161.
- Wagner, A. 2000. Robustness against mutations in genetic networks of yeast. *Nature Genet.* 24:355-361.

- Wagner, A. (2005). *Robustness and evolvability in living systems*. Princeton University Press, New Jersey.
- Wagner, A. 2008. Robustness and evolvability: a paradox resolved. *Proc. Biol. Sci.* 275:91-100.
- Wain-Hobson, S. 1993. The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:878-883.
- Walsh, C. P., y G. L. Xu. 2006. Cytosine methylation and DNA repair. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 301:283-315.
- Watts, J. M., K. K. Dang, R. J. Gorelick, C. W. Leonard, J. W. Bess, Jr., R. Swanstrom, C. L. Burch, y K. M. Weeks. 2009. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* 460:711-716.
- Wichman, H. A., M. R. Badgett, L. A. Scott, C. M. Boulianne, y J. J. Bull. 1999. Different trajectories of parallel evolution during viral adaptation. *Science* 285:422-424.
- Wichman, H. A., L. A. Scott, C. D. Yarber, y J. J. Bull. 2000. Experimental evolution recapitulates natural evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355:1677-1684.
- Wilke, C. O. 2003. Probability of fixation of an advantageous mutant in a viral quasispecies. *Genetics* 163:467-474.
- Wilke, C. O., J. L. Wang, C. Ofria, R. E. Lenski, y C. Adami. 2001. Evolution of digital organisms at high mutation rates leads to survival of the flattest. *Nature* 412:331-333.
- Witherell, G. W., y O. C. Uhlenbeck. 1989. Specific RNA binding by Q β coat protein. *Biochemistry* 28:71-76.
- Wright, S. 1932. The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. *Proc. Sixth Intern. Congr. Genet.* 356-366.
- Wright, S. 1982. The shifting balance theory and macroevolution. *Annu. Rev. Genet.* 16:1-19.

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Tabla suplementaria 1. Mutaciones fijadas en los genomas de Φ X174, G4, f1, Q β , MS2 y SP en los linajes de acumulación de mutaciones (tres linajes por especie viral). Se muestra la eficacia relativa y su error estándar, los genes en los que se encuentran, las sustituciones nucleotídicas encontradas (sustitución y posición nucleotídica indicadas), y el cambio aminoacídico (sustitución y posición aminoacídica en el gen indicadas). En el caso de las mutaciones en genes solapantes, las sustituciones respectivas están indicadas, y sólo se indican los cambios de aminoácido en aquellos cambios nucleotídicos no sinónimos. Las posiciones genómicas en Φ X174 están numeradas por convención tomando como nucleótido 1 al único sitio Pst I.

Especie	Linaje	Eficacia relativa	Gen	Sustitución nucleotídica	Sustitución aminoacídica
Φ X174	1	0.228 ± 0.025	C	G223A	Ala31Thr
			D	T419C	-
			F	A1377G	Gln126Arg
			F	G1417A	-
			Intergénica	C2312T	-
			H	A3253G	Lys108Arg
			Intergénica	T3967C	-
			A	G4166A	Met62Ile
			A	C4329T	Arg117Cys
			A/A*	G4686A	Gly236Ser/Gly64Ser
			A/A*	G5067A	Ala363Thr/Ala191Thr
			A/A*/B	G5153A	-/-Asp27Asn
			A/A*/B	G5357T	-/-Asp95Tyr
	2	0.240 ± 0.024	A/A*/K	T121C	-/-Leu24Pro
			D	A424G	Gln12Arg
			D/E	G774A	Ala129Thr/-
			Intergénica	G972A	-
			F	G1258A	Met86Ile
			Intergénica	A2361G	-
G			G2493A	-	
G			T2676C	-	
H			G3359A	Met143Ile	
H			G3470A	-	
A/A*	G4592A	-/-			
A/A*	A4657G	Asp226Gly/Asp54Gly			

			A/A*/B	A5090G	-/-Lys6EGlu
3	0.238 ± 0.031		A/A*	G50A	Asp486Asn/Asp314Asn
			K/C	G210A	Val54Ile/-
			D	G394A	Ser2Asn
			D	A445G	Lys19Arg
			D/E	G731A	-/Arg55Gln
			D/E	A827G	-/Tyr87Cys
			Intergénica	T1000C	-
			F	A1091G	Ile31Val
			F	G1268A	Val90Ile
			F	G1537A	-
			F	A2224G	-
			Intergénica	A2306G	-
			H	G2984A	Met18Ile
			H	G3333A	Gly135Ser
			H	A3515G	-
			H	G3611A	-
			H	G3704A	-
			H	T3790C	Val287Ala
			A	T4165C	Met62Thr
			A/A*	G4994A	Met338Ile/Met166Ile
A/A*	A5040G	Met354Val/Met182Val			
A/A*	G5059A	Gly360Asp/Gly188Asp			
G4	1	0.115 ± 0.030	p03	A226G	-
			p03	A610C	-
			p03	G691A	-
			p03/p04/p07	G1667A	Gly537Arg/Gly324Arg/-
			p03/p04/p07	A1683G	Asn542Ser/Asn329Ser/ Thr16Ala
			p09/p10	A2159G	Thr62Ala/-
			p01	T2633C	Ser12Pro
			p01	A3305C	Ile236Leu
			p01	G3463A	-
			p01	A3526G	-
			p13	C4571G	Ala3Gly
			p13	C4580T	Ala6Val
			p13	A4688G	Asn42Ser
			p13	G4762T	Ala67Ser
			p13	T4809C	-
p13	A4828G	Asn89Asp			
2	0.457 ± 0.019		p03/p04	G700A	Met214Ile/Met1Ile
			p03/p04	G1267A	-/-
			p03/p04/p05	A1533G	Asn492Ser/Asn279Ser/-

			p03/p04/p05	A1565G	Thr503Ala/Thr290Ala/ Asn97Ser
			p08	A1823G	Glu35Gly
			p09	A2036G	Ile21Val
			p09/p10	G2306A	Val111Ile/-
			p10	A2437G	Asp95Gly
			p13	G5148C	-
			p13	G5314A	Gly251Ser
	3	0.368 ± 0.018	p03	C285T	Ala76Val
			p03	A315G	Lys86Arg
			p03/p04	G991A	Met311Ile/Met98Ile
			p03/p04/p05	A1449G	Lys464Arg/Lys251Arg/-
			p01	A3833G	Asn412Asp
			p13	C4746T	-
f1	1	0.261 ± 0.055	pII	A58G	Asn154Asp
			pII	G280A	Val228Ile
			pV	G1037A	-
			pV	G1050A	Val70Ile
			pIII	A1727T	Asn50Ile
			pIII	A1937G	Tyr120Cys
			pIII	G2428A	Ala284Thr
			pIII	C2468T	Ala297Val
			pIII	T2478C	-
			pIII	G2567A	Gly330Asp
			pIII	G2594A	Gly339Asp
			pIII	T2812C	Phe412Leu
			pIII	G2820A	-
			pIII	G2835A	-
			pVI	G2862A	Val3Ile
			pI	A3348G	-
			pI	T3522C	-
			pI	G4044A	-
			pIV	A4502G	Asn95Asp
			pIV	G4544A	Asp109Asn
			pIV	G4763A	Asp182Asn
			pIV	G4853A	Ala212Thr
			Intergénica	A5833G	-
			Intergénica	G5875A	-
			Intergénica	G5978A	-
			Intergénica	G5999A	-
			pII	G6069A	Gly22Ser
			pII	G6121A	Gly39Asp
			pII	G6159A	Asp52Asn

2	0.580 ± 0.052	pII	G388A	Asp264Asn
		pII/pX	G537A	-/-
		pII/pX	G748A	Val384Ile/Val85Ile
		pVIII	G1309A	-
		pVIII	G1360A	-
		pVIII	G1415A	Ala39Thr
		pIII	A1593G	-
		pIII	G1609A	Val11Ile
		pIII	A1667G	His30Arg
		pIII	G1837A	Gly87Ser
		pIII	G1866A	-
		pIII	C1887T	-
		pIII	G1912A	Asp112Asn
		pIII	T2118C	-
		pIII	T2239C	Tyr221His
		pIII	G2353A	Gly259Ser
		pIII	A2425G	Asn283Asp
		pIII	G2449A	Glu291Lys
		pVI	T2983C	Phe43Ser
		pVI	G3089A	-
		pI	T3261C	-
		pIV	G4544A	Asp109Asn
		pIV	G4838A	Val207Ile
		pIV	G5382A	Gly388Asp
		Intergénica	G5616C	-
		Intergénica	C5684T	-
		Intergénica	G5952A	-
pII	G6084A	Ala27Thr		
3	0.185 ± 0.036	pII	G300A	-
		pII	C315T	-
		pIII	G1774A	Gly66Ser
		pIII	G1859A	Gly94Asp
		pIII	G1883A	Gly102Asp
		pIII	T2466C	-
		pIII	A2491G	Lys305Glu
		pIII	G2566A	Gly330Ser
		pIII	A2760G	-
		pIV	G4745A	Ala176Thr
		pIV	G4984A	-
		pIV	A5085G	Gln289Arg
		Intergénica	C5825T	-
		Intergénica	G5969A	-
		pII	G6143A	-

			pII	G6194A	-
			pII	A6214G	His70Arg
			pII	G6228A	Ala75Thr
			pII	G6281A	-
			pII	G6350A	-
Qβ	1	0.257 ± 0.045	Maturasa	A424G	-
			Maturasa	A713G	Arg219Gly
			Maturasa	A1063G	-
			Maturasa	A1312G	-
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	A1452G	-/-
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	A1567G	Thr76Ala/Thr76Ala
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	T1626C	-/-
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	C1692T	-/-
			<i>Read Through</i>	T2001C	-
			<i>Read Through</i>	G2215A	-
			Replicasa	C2244T	Val1Met
			Replicasa	G2350A	-
			Replicasa	A2427G	-
			Replicasa	C2526T	Leu71Phe
			Replicasa	C2560T	-
			Replicasa	A2763G	-
			Replicasa	T2967C	Leu251Arg
			Replicasa	T3101G	-
			Replicasa	T3369C	Ser418Gly
			Replicasa	A3601G	-
			Replicasa	A3651G	-
			Intergénica	C3657T	-
	2	0.228 ± 0.030	Maturasa	A4135G	Ser76Leu
			Maturasa	C285T	Asp100Gly
			Maturasa	A357G	-
			Maturasa	T469C	-
			Maturasa	A550G	-
			Maturasa	T994C	Ile331Met
			Maturasa	A1051G	Ile360Val
			Maturasa	A1136G	Ser412Phe
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	C1293T	-/-
			<i>Read Through</i>	T1662C	-
			<i>Read Through</i>	G2262A	-
			Replicasa	C2307T	-
			Replicasa	A2439C	-

			Replicasa	A2931G	Asp500Gly		
3	0.400 ± 0.024	Maturasa	A3848G	-			
		Maturasa	C262T	-			
		Maturasa	C407T	Ser189Phe			
		Maturasa	C624T	Tyr2154Cys			
		Maturasa	A819G	-			
		Maturasa	T823C	-			
		Maturasa	C826A	Glu282Gly			
		Maturasa	A903G	-			
		Cubierta/ <i>Read Through</i>	A1141G	-/-			
		<i>Read Through</i>	A1383G	Thr18Ala2			
		<i>Read Through</i>	A1885G	Asn191Ser			
		<i>Read Through</i>	A1913G	Thr211Ala			
		Replicasa	A1972G	-			
		Replicasa	G2215A	Thr21Ile			
		Replicasa	C2382T	Asn47Asp			
		Replicasa	C2411T	Asn69Ser			
		Replicasa	A2488G	Asn269Asp			
		Replicasa	A2555G	Lys483Glu			
		Replicasa	A3154G	Thr498Ala			
		Replicasa	A3796G	Gln543Arg			
SP	1	0.109 ± 0.049	Maturasa	A208G	Asn52Asp		
			Maturasa	T236C	Val61Ala		
			Maturasa	T294C	-		
			Maturasa	G362A	Gly103Asp		
			Maturasa	G537C	-		
			Maturasa	G1099A	-		
			Maturasa	C1290T	-		
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	C1548T	Ala41Val/Ala41Val		
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	C1699T	-/-		
			<i>Read Through</i>	G1856A	Gly144Arg		
			<i>Read Through</i>	G2141C	Asp239His		
			Replicasa	C2752T	Thr104Met		
			Replicasa	C2931T	His164Tyr		
			Replicasa	G3381A	Val314Ile		
			Intergénica	C4242T	-		
			2	0.122 ± 0.021	Maturasa	A648G	-
					Maturasa	G1007A	Arg103His
Maturasa	A1321G	Ile423Val					
<i>Read Through</i>	C1908G	Pro161Arg					
<i>Read Through</i>	T1997C	Tyr191His					

			Replicasa	A2523G	Met28Val
			Replicasa	C2707T	Ala89Val
			Replicasa	A2779G	Tyr113Cys
			Replicasa	C3149T	-
			Replicasa	A3456G	Ile339Val
			Replicasa	A3796G	Lys452Arg
3	0.383 ± 0.024		Maturasa	A516G	-
			Maturasa	A1332G	-
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	A1457G	Lys11Glu/Lys11Glu
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	A1486G	-/-
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	T1627G	Ile67Met/Ile67Met
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	C1639G	Asn71Lys/Asn71Lys
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	C1653A	Thr76Lys/Thr76Lys
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	C1674T	Ser83Phe/Ser83Phe
			Cubierta/ <i>Read Through</i>	C1682A	-/-
			<i>Read Through</i>	C1981G	Asp185Glu
			<i>Read Through</i>	A2003G	Arg193Gly
			<i>Read Through</i>	G2012A	Glu196Lys
			<i>Read Through</i>	A2014G	Glu196Lys
			<i>Read Through</i>	T2016G	Val197Gly
			<i>Read Through</i>	A2392G	-
			<i>Read Through</i>	T2419A	-
			Replicasa	A2499G	Ile20Val
			Replicasa	A3394G	Glu318Gly
			Replicasa	C3581T	-
MS2	1	0.473 ± 0.101	Ensamblaje	A333G	-
			Ensamblaje	A845G	Lys239Arg
			Ensamblaje	C894T	-
			Ensamblaje	C1125T	-
			Ensamblaje	A1126G	Ile333Val
			Ensamblaje	A1185G	-
			Replicasa	A2036G	-
			Replicasa	A2363G	-
			Replicasa	A2466G	Asn236Asp
			Replicasa	C2534T	-
			Replicasa	A3037G	Tyr426Cys
			Replicasa	A3226G	Lys489Arg
			Replicasa	A3303G	Lys515Glu
2	0.215 ± 0.027		Ensamblaje	A436G	Ser103Gly
			Ensamblaje	A541G	Asn138Asp

		Ensamblaje	A614G	Lys162Arg
		Ensamblaje	C961A	Leu278Arg
		Ensamblaje	T962G	Leu278Arg
		Ensamblaje	A963G	Leu278Arg
		Ensamblaje	G964T	Gly279Cys
		Ensamblaje	C1104T	-
		Cubierta	C1637T	-
		Lisis/Replicasa	A1860G	-/Ser34Gly
		Replicasa	C1979T	-
		Replicasa	A2641G	Asp294Gly
		Replicasa	A2732T	Lys324Asn
		Replicasa	T3138G	Ser460Ala
		Replicasa	A3143G	-
		-	A3519G	-
3	0.250 ± 0.012	Ensamblaje	C354T	-
		Ensamblaje	A361G	Ser78Gly
		Ensamblaje	A884G	Gln252Arg
		Ensamblaje	G937C	Ala270Pro
		Ensamblaje	T944C	Leu272Ser
		Ensamblaje	G946C	Ala273Pro
		Ensamblaje	G1119T	Glu330ASp
		Ensamblaje	A1166G	Gln346Arg
		Cubierta	A1535G	-
		Cubierta	T1632C	Ser100Pro
		Cubierta/Lisis	C1712T	-/Thr12Ile
		Replicasa	A1920G	Tyr54Ala
		Replicasa	C2009T	-
		Replicasa	A2142G	Tyr128Ala
		Replicasa	A2249T	-
		Replicasa	A2447G	-

Tabla suplementaria 2. Mutaciones fijadas en los genomas de Φ X174, G4, f1, Q β , MS2 y SP tras la adaptación y recuperación de eficacia (tres linajes por especie viral). Se realizaron 50 pases excepto para el linaje 3 de G4, el linaje 2 de Q β y el linaje 3 de SP que se llevaron a cabo 49 pases, y para el linaje 2 de SP que se hicieron 46. Se muestran la eficacia relativa y su error estándar, los genes en los que se encuentran, las sustituciones nucleotídicas encontradas (sustitución y posición nucleotídica indicadas), y el cambio aminoacídico (sustitución y posición aminoacídica en el gen indicadas). En el caso de las mutaciones en genes solapantes, las sustituciones respectivas están indicadas, y sólo se indican los cambios de aminoácido en aquellos cambios nucleotídicos no sinónimos. Las posiciones genómicas en Φ X174 están numeradas por convención tomando como nucleótido 1 al único sitio Pst I.

Especie	Linaje	Eficacia relativa final	Gen	Sustitución nucleotídica	Sustitución aminoacídica
Φ X 174	1	1.241 ± 0.099	F	A1295G	Asn99Asp
			F	G1377A	Arg126Gln
			F	A1641G	Gln214Arg
			A	A4166G	Ile62Met
			A/A*	C4760T	-/-
			A/A*	A5067G	Thr363Ala/Thr191Ala
			A/A*/B	C5185T	Thr402Met/Thr230Met/-
	2	0.819 ± 0.003	D/E	C765T	Arg126Cys/-
			Intergénica	C981T	-
			F	C1648T	-
	3	1.076 ± 0.090	D	C464T	-
			Intergénica	G2290A	-
			H	C3790T	Ala287Val
			A	C4165T	Thr62Met
			A/A*	A5059G	Asp360Gly/Asp188Gly
G4	1	1.137 ± 0.055	p03/p04/p07	A1667G	Arg537Gly
			p09	C2125T	-
			p13	G4828A	Asp89Asn
			p13	G5044A	Ala161Thr
	2	1.095 ± 0.053	p03/p04	T1332C	Ile425Thr/Ile212Thr
	3	1.150 ± 0.129	p03	T285C	Val76Ala
			p03/p04	A991G	Ile311Met/Ile98Met

			p01	A2849G	Asn84Asp
f1	1	0.542 ± 0.015	pIII	T1727A	Ile50Asn
			pIII	C2478T	-
			pIV	C4367T	Pro50Ser
			Intergénica	G5977A	-
	2	0.745 ± 0.039	pV	G1043A	-
			pIII	T1887C	-
			pIII	C1898G	Pro107Arg
			pIII	A1912G	Asn112Asp
			pIII	G2160T	Met194Ile
			pVI	C2983T	Ser43Phe
			Intergénica	C5616G	-
			pII	A6062G	-
			pII	G6305A	-
	3	0.935 ± 0.014	pII	T454C	Phe286Leu
			pIII	G2445A	Met289Ile
			pIII	C2466T	-
			pIV	A4745G	Thr176Ala
			pIV	G5085A	Arg289Gln
			pII	A6228G	Thr75Ala
Qβ	1	1.050 ± 0.032	Intergénica	C36T	-
			Maturasa	C80T	-
			Maturasa	G713A	Gly218Arg
			<i>Read-through</i>	C2001T	-
			<i>Read-through</i>	G2215A	Val292Met
			<i>Read-through</i>	T2250A	-
			Replicasa	T2526C	-
			Replicasa	T2560C	Phe71Leu
			Replicasa	G3101T	Arg251Leu
			Replicasa	G3114T	-
			Replicasa	G3601A	Gly418Ser
			Intergénica	G4125C	-
	2	1.013 ± 0.042	Intergénica	C36T	-
			Maturasa	T143C	Phe29Leu
			Maturasa	T285C	Leu76Ser
			Maturasa	G357A	Gly100Asp
			Maturasa	A386G	Asn110Asp
			Maturasa	G550A	-
			Maturasa	G1051A	Met331Ile
			Maturasa	T1293C	Phe412Ser
			Maturasa	G1315C	Lys419Asn
			Maturasa	A1604G	-

			<i>Read-through</i>	A1776G	Gln88Arg
			<i>Read-through</i>	T1961G	Leu207Arg
			<i>Read-through</i>	G2215A	Val292Met
			Replicasa	G2350A	-
			Replicasa	C2439A	-
			Replicasa	T3101G	Leu251Arg
3	0.937 ± 0.032		Intergénica	C36T	-
			Maturasa	T143C	Phe29Leu
			Maturasa	A331G	-
			Maturasa	C470A	Gln138Lys
			Maturasa	A535G	-
			Maturasa	T624C	Phe189Ser
			Maturasa	A710G	Ile218Val
			Maturasa	C815A	Leu253Met
			Maturasa	G819A	Cys254Tyr
			Maturasa	C823T	-
			Maturasa	A826C	-
			Maturasa	G1141A	-
			Cubierta/ <i>Read-through</i>	G1441T	Ala34Ser/Ala34Ser
			<i>Read-through</i>	A1776G	-
			<i>Read-through</i>	G2215A	Val292Met
			Replicasa	G2350A	-
			Replicasa	T2411C	Ile21Thr
			Replicasa	G3154A	Asn269Asp
			Replicasa	A3412C	Thr355Pro
			Replicasa	G3796A	Glu483Lys
			Replicasa	G3977A	Arg543Gln
			Replicasa	T4048A	Cys567Ser
			Replicasa	A4068G	-
			Replicasa	C4071G	-
SP	1	1.020 ± 0.015	Maturasa	G208A	Asp52Asn
			Maturasa	C236T	Ala61Val
			Maturasa	A362G	Asp103Gly
			Maturasa	C537G	-
			Maturasa	A1099G	Met349Val
			Maturasa	T1290C	-
			Cubierta/ <i>Read-through</i>	T1548C	Val41Ala/ Val41Ala
			<i>Read-through</i>	T1887G	Val154Gly
			<i>Read-through</i>	C2141G	His239asp
			Replicasa	C2555T	-
			Replicasa	A2751G	Met104Val
			Replicasa	T2931C/	Tyr164Arg

			A2932G	
		Replicasa	A3381G	Ile314Val
		Replicasa	C3536T	-
2	1.079 ± 0.051	Maturasa	G648A	-
		Maturasa	A843G	-
		Maturasa	CA1059A	-
		Maturasa	G1321A	Val423I
		Cubierta/ <i>Read-through</i>	G1577C	Val51Leu/ Val51Leu
		Cubierta/ <i>Read-through</i>	A1630C	Lys68Asn/Lys68Asn
		Cubierta/ <i>Read-through</i>	G1740T	Arg105Leu/Arg105Leu
		<i>Read-through</i>	G1908C	Arg161Pro
		<i>Read-through</i>	C1997T	His191Tyr
		Replicasa	G2523A	Val28Met
		Replicasa	T2707C	Val89Ala
		Replicasa	A2717G	-
		Replicasa	G2729A	-
		Replicasa	G2779A	Cys113Tyr
		Replicasa	T3149C	-
		Replicasa	G3456A	Val339Ile
		Replicasa	C3581T	-
		Replicasa	G3796A	Arg452Lys
		Replicasa	G4047A	Ala536Thr
3	1.042 ± 0.064	Maturasa	C611G	Asn186Try
		Cubierta/ <i>Read-through</i>	G1486A	-
		Cubierta/ <i>Read-through</i>	G1627T	Val51Leu/Val51Leu
		Cubierta/ <i>Read-through</i>	G1639C	Lys71Asn/Lys71Asn
		Cubierta/ <i>Read-through</i>	A1653C	Lys76Thr/ Lys76Thr
		Cubierta/ <i>Read-through</i>	T1674C	Phe83Ser/Phe83Ser
		<i>Read-through</i>	A1682C	-/-
		<i>Read-through</i>	G1981C	Glu185Asp
		<i>Read-through</i>	G2003A	Gly193Arg
		<i>Read-through</i>	A2012G/ G2014A	Lys196Glu
		<i>Read-through</i>	G2016T	Gly197Val
		<i>Read-through</i>	A2419T	-
		Replicasa	G2499A	Val20Ile
		Replicasa	C2633T	-
		Replicasa	G3394A	Gly318Glu
		Replicasa	T3581C	-

			Replicasa	G4047A	Ala536Thr		
MS2	1	0.974 ± 0.033	Ensamblaje	T153C	-		
			Ensamblaje	T466C	Tyr113His		
			Intergénica	T1328C	-		
			Cubierta	A1335G	-		
			Replicasa	G2466A	Asp236Asn		
			Replicasa	A2624G	-		
			Replicasa	G3037A	Cys426Tyr		
			Replicasa	G3303A	Glu515Lys		
			Intergénica	C3436G	-		
			Intergénica	C3508T	-		
			2	0.977 ± 0.046	Ensamblaje	T310G	Ser61Ala
					Ensamblaje	G541A	Asp138Asn
					Ensamblaje	G614A	Arg162Lys
					Ensamblaje	G679A	Asp184Asn
Ensamblaje	G1307A	Arg393Lys					
Intergénica	A1332G	-					
Cubierta	A1335G	-					
Lisis/ Replicasa	G1860T	Glu61Asp/Gly34Cys					
Replicasa	G2641A	Gly294Asp					
Replicasa	T2732A	Asn324Lys					
Replicasa	A3287G	-					
Replicasa	G3312C	Gly518Arg					
3	0.932 ± 0.013	Ensamblaje			T261C	-	
		Ensamblaje			T373C	Try82Arg	
		Ensamblaje	G628C	Ala167Pro			
		Ensamblaje	C636T	-			
		Ensamblaje	T639A	-			
		Ensamblaje	C646T	Arg173Cys			
		Ensamblaje	C675A	Asn182Lys			
		Ensamblaje	A835G	Thr236Ala			
		Ensamblaje	G884A	Arg252Gln			
		Ensamblaje	C937G	Pro270Ala			
		Ensamblaje	C944T	Ser272Lys			
		Ensamblaje	C946G	Pro273Ala			
		Ensamblaje	C1068A	-			
		Ensamblaje	G1166A	Arg346Gln			
		Intergénica	A1325G	-			
		Cubierta	G1535A	-			
		Cubierta	C1632T	Pro100Ser			
		Replicasa	T2249A	-			
		Intergénica	A3458G	-			

Tabla suplementaria 3. Lista de las mutaciones introducidas en Φ X174 mediante mutagénesis dirigida. La posición genómica de cada sustitución nucleotídica está indicada, así como el gen el que se encuentra, la sustitución aminoacídica, y la eficacia relativa con su error estándar. Una eficacia relativa de 1 indica que el mutante es selectivamente neutral respecto al wild-type, mientras que valores de 0 indican que la mutación es letal.

Mutación	Gen	Sustitución aminoacídica	Eficacia relativa
C357A	C	-	0.963 \pm 0.009
A393T	C/D	STOP87Cys/Ser2Cys	0 (letal)
A510T	D	Lys41STOP	0.805 \pm 0.026
T825A	D	Leu146Ile/Asn86Lys	0.599 \pm 0.105
A827T	D/E	Leu146Ile/Tyr87Phe	0.853 \pm 0.071
G915C	J	Gly23Ala	0.898 \pm 0.09
T1006G	F	-	0.764 \pm 0.072
C1023A	F	Ala8Asp	0.635 \pm 0.036
C1174T	F	-	0.836 \pm 0.02
C1217T	F	Pro73Ser	0.643 \pm 0.057
T1234A	F	Tyr78STOP	0 (letal)
G1238C	F	Glu80Gln	0.910 \pm 0.032
A1251C	F	Lys84Thr	1.000 \pm 0.026
A1295C	F	Asn99Thr	0.921 \pm 0.03
T1432A	F	-	1.034 \pm 0.013
T1516C	F	-	0.979 \pm 0.026
T1663G	F	-	0.988 \pm 0.057
C1770G	F	Ser257Try	0 (letal)
T1794G	F	Val265Gly	0 (letal)
T1805G	F	Tyr269Asp	0 (letal)
G1844A	F	Gly282Ser	0 (letal)
T1870G	F	-	0.814 \pm 0.148
G2208A	F	Try403STOP	0 (letal)
T2350A	Intergénica	-	0.819 \pm 0.029
G2511T	G	-	0.987 \pm 0.019
T2562A	G	Phe56Leu	0.514 \pm 0.084
T2630A	G	Ile79Asn	0.749 \pm 0.061
T3233G	H	Asp101Glu	1.028 \pm 0.03
G3236A	H	-	1.025 \pm 0.043

G3377T	H	Glu149Asp	0.965 ± 0.017
G3422C	H	Glu164Asp	0.984 ± 0.019
C3483T	H	Arg185Cys	0 (lethal)
T3569C	H	-	0.984 ± 0.035
G3599T	H	Gln223His	0.970 ± 0.024
G3683C	H	Met251Ile	0.947 ± 0.005
T4201A	A	Val74Asp	0.421 ± 0.023
G4352C	A	Try124Cys	0 (lethal)
A4458C	A	Ile160Leu	0.925 ± 0.023
T4628G	A/A*	Asn216Lys/Asn44Lys	1.028 ± 0.124
T4643G	A/A*	- / -	0.886 ± 0.034
T4748C	A/A*	- / -	0.886 ± 0.004
C4972G	A/A*	Pro331Arg/ Pro159Arg	0.272 ± 0.024
C5192G	A/A*/B	Cys404Try/ Cys232Try/Leu40Val	0.033 ± 0.033
A5287G	A/A*/B	Lys436Arg/ Lys264Arg/ -	0.969 ± 0.001
T5344G	A/A*/B	Phe455Cys/ Phe283Cys/Ile90Met	0.904 ± 0.028

Tabla suplementaria 4. Lista de las mutaciones introducidas en Q β mediante mutagénesis dirigida. La posición genómica de cada sustitución nucleotídica está indicada, así como el gen el que se encuentra, la sustitución aminoacídica, y la eficacia relativa con su error estándar. Una eficacia relativa de 1 indica que el mutante es selectivamente neutral respecto al wild-type, mientras que valores de 0 indican que la mutación es letal.

Mutación	Gen	Sustitución aminoacídica	Eficacia relativa
A161C	Maturasa	Thr35Pro	1.029 \pm 0.007
A328G	Maturasa	-	1.039 \pm 0.029
C665G	Maturasa	Leu203Val	0.590 \pm 0.016
G733U	Maturasa	Try225Cys	0 (letal)
U772G	Maturasa	Phe238Leu	0.666 \pm 0.078
A891U	Maturasa	Tyr278Phe	0.940 \pm 0.056
C939G	Maturasa	Pro294Arg	0.963 \pm 0.023
C1096U	Maturasa	-	1.010 \pm 0.045
G1149C	Maturasa	Arg364Pro	0 (letal)
U1165A	Maturasa	-	0.996 \pm 0.017
G1283U	Maturasa	Asp409Tyr	0 (letal)
U1288G	Maturasa	Ser410Arg	0 (letal)
G1329A	Intergénica	-	0 (letal)
C1442A	Cubierta / <i>Read-through</i>	Ala34Asp/ Ala34Asp	0 (letal)
U1485A	Cubierta / <i>Read-through</i>	- / -	0.992 \pm 0.052
A1525U	Cubierta / <i>Read-through</i>	Asn62Tyr / Asn62Tyr	1.071 \pm 0.027
U1809C	<i>Read-through</i>	-	1.008 \pm 0.061
C1814U	<i>Read-through</i>	Pro158Leu	1.022 \pm 0.041
G1895U	<i>Read-through</i>	Arg185Leu	0.976 \pm 0.012
A2090U	<i>Read-through</i>	Gln250Leu	0.802 \pm 0.011
C2360G	Replicasa	Thr4Arg	0 (letal)
U2379A	Replicasa	-	0 (letal)
G2787U	Replicasa	Glu146Asp	0.936 \pm 0.010
G2793U	Replicasa	Met148Ile	0.941 \pm 0.031
C2797A	Replicasa	Arg150Ser	0.953 \pm 0.011
U3027C	Replicasa	-	1.062 \pm 0.032
U3075C	Replicasa	-	1.036 \pm 0.044
A3094G	Replicasa	Ile249Val	1.043 \pm 0.003
U3101G	Replicasa	Leu251Arg	0 (letal)

U3210G	Replicasa	Cys287Try	0 (letal)
G3213U	Replicasa	Glu288Asp	0.988 ± 0.038
G3397C	Replicasa	Asp350His	0.772 ± 0.034
G3415U	Replicasa	Val356Phe	0 (letal)
U3452C	Replicasa	Val368Ala	0.702 ± 0.019
U3483G	Replicasa	-	1.052 ± 0.014
G3661U	Replicasa	Val438Leu	0.810 ± 0.02
U3686A	Replicasa	Val446Glu	0 (letal)
G3815C	Replicasa	Arg489Pro	1.068 ± 0.041
G3916C	Replicasa	Asp523His	0.805 ± 0.038
U3951G	Replicasa	Asp534Glu	1.032 ± 0.041
G4066U	Replicasa	Ala573Ser	0.966 ± 0.091
U4082A	Replicasa	Phe578Y	0.679 ± 0.019

Tabla suplementaria 5. Lista de las mutaciones sinónimas introducidas en Φ X174 mediante mutagénesis dirigida. La posición genómica de cada sustitución nucleotídica está indicada, así como el gen el que se encuentra, y la eficacia relativa con su error estándar. Una eficacia relativa de 1 indica neutralidad respecto al wild-type, mientras que valores de 0 indican que la mutación es letal.

Mutación	Gen	Eficacia relativa
T432C	D	0.997 ± 0.017
T825C	D/E	0.999 ± 0.017
A955G	J	0.901 ± 0.014
A986C	Intergénica	1.018 ± 0.013
T1324A	F	1.021 ± 0.004
T1456G	F	1.024 ± 0.004
C1498A	F	1.003 ± 0.030
T1558G	F	1.018 ± 0.009
T1925C	F	1.031 ± 0.002
T1981G	F	1.005 ± 0.011
T2002C	F	0.995 ± 0.017
G2206A	F	0.999 ± 0.027
C2364A	Intergénica	0.815 ± 0.005
T2685C	G	1.006 ± 0.011
A2865C	G	1.007 ± 0.022
G3254A	H	0.974 ± 0.016
G3545A	H	1.017 ± 0.007
G3704A	H	0.976 ± 0.001
T3833A	H	0.981 ± 0.025
A3909C	H	0.986 ± 0.003
C3939G	Intergénica	1.013 ± 0.017
A3962C	Intergénica	1.009 ± 0.021
C4094G	A	1.009 ± 0.018
C4205T	A	1.018 ± 0.013
C4226T	A	1.013 ± 0.036
T4247A	A	1.027 ± 0.003
G4505A	A/A*	1.045 ± 0.013
C4682A	A/A*	0.995 ± 0.011
T4934C	A/A*	1.042 ± 0.034
C5006T	A/A*	1.028 ± 0.014

Tabla suplementaria 6. Lista de las mutaciones sinónimas introducidas en Q β mediante mutagénesis dirigida. La posición genómica de cada sustitución nucleotídica está indicada, así como el gen el que se encuentra, y la eficacia relativa con su error estándar. Una eficacia relativa de 1 indica neutralidad respecto al wild-type, mientras que valores de 0 indican que la mutación es letal.

Mutación	Gen	Eficacia relativa
C28G	Intergénica	0.614 \pm 0.025
G30A	Intergénica	0.856 \pm 0.007
A52C	Intergénica	0 (letal)
C628T	Maturasa	0.913 \pm 0.007
T781A	Maturasa	1.030 \pm 0.022
T910C	Maturasa	1.019 \pm 0.002
T991A	Maturasa	0.996 \pm 0.019
T1001C	Maturasa	1.001 \pm 0.016
C1048T	Maturasa	0.944 \pm 0.005
C1118A	Maturasa	0.822 \pm 0.080
T1186G	Maturasa	0.960 \pm 0.009
C1258A	Maturasa	1.003 \pm 0.016
C1303A	Maturasa	0.798 \pm 0.028
C1332A	Intergénica	0 (letal)
T1359A	Cubierta / <i>Read-through</i>	0.978 \pm 0.007
C1407T	Cubierta / <i>Read-through</i>	0.980 \pm 0.020
C1437G	Cubierta / <i>Read-through</i>	1.011 \pm 0.021
A1452G	Cubierta / <i>Read-through</i>	0.983 \pm 0.013
G1476A	Cubierta / <i>Read-through</i>	1.021 \pm 0.005
G1545A	Cubierta / <i>Read-through</i>	0.969 \pm 0.026
G1818T	<i>Read-through</i>	0.954 \pm 0.021
G1929A	<i>Read-through</i>	0.911 \pm 0.008
T1971C	<i>Read-through</i>	1.019 \pm 0.005
T2097C	<i>Read-through</i>	1.010 \pm 0.012
G2348A	Intergénica	0 (letal)
T2448C	Replicasa	1.003 \pm 0.010
G2466A	Replicasa	0.993 \pm 0.016
C2862T	Replicasa	0.965 \pm 0.017
T3294C	Replicasa	0.989 \pm 0.022
T3309A	Replicasa	0.976 \pm 0.029
T4017C	Replicasa	0.967 \pm 0.025
T4098A	Replicasa	0.971 \pm 0.010

