

# Estudio y diagnóstico de nuevas virosis emergentes en Vid (*Vitis vinifera* L.)

Félix Eduardo Morán Villamizar

Programa de doctorado en  
Biomedicina y Biotecnología

**ivia**

instituto valenciano  
de investigaciones agrarias

# Estudio y diagnóstico de nuevas virosis emergentes en vid (*Vitis vinifera* L.)

Tesis doctoral

FÉLIX EDUARDO MORÁN VILLAMIZAR

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

DIRECTORES:

DR. ANTONIO OLMOS CASTELLÓ

DRA. ANA BELÉN RUIZ GARCÍA

Valencia, Enero 2022





## INFORME SOBRE EL DEPÓSITO DE LA TESIS DOCTORAL

Dr. Antonio Olmos Castelló y la Dra. Ana Belén Ruíz García científicos vinculados al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), en calidad de directores de la tesis doctoral de D. Félix Eduardo Morán Villamizar, adscrito al Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología de la Universitat de València.

### INFORMAN

Que la tesis titulada “Estudio y diagnóstico de nuevas virosis emergentes en Vid (*Vitis vinifera* L.)” se ha desarrollado bajo su dirección y supervisión, y que el trabajo de investigación realizado y la memoria del mismo, ha sido elaborada por el doctorado y cumple los requisitos científicos y formales para proceder al acto de defensa de la Tesis Doctoral.

El Director de la Tesis,

OLMOS  
CASTELLO  
ANTONIO  
AGUSTIN -  
29157990Q

Firmado digitalmente por  
OLMOS CASTELLO  
ANTONIO AGUSTIN  
- 29157990Q  
Fecha: 2022.01.11  
16:11:01 +01'00'

Fdo. Antonio Olmos Castelló

El Directora de la Tesis,

ANA  
BELEN|  
RUIZ|  
GARCIA

Firmado digitalmente por  
ANA BELEN|RUIZ|  
GARCIA  
Fecha: 2022.01.11  
16:08:02 +01'00'

Fdo. Ana Belén Ruíz García

Tutor académico de la Tesis,

MARIA  
JESUS|  
MARCOTE|  
ZARAGOZA

Firmado digitalmente  
por MARIA JESUS|  
MARCOTE|ZARAGOZA  
Fecha: 2022.01.12  
11:35:46 +01'00'

Fdo. María Jesús

Marcote Zaragoza

La presente tesis se ha desarrollado enmarcada en un programa de formación de personal investigador en agroalimentación, destinado a centros de investigación INIA-CCAA (FPI-INIA); con número de referencia de la ayuda: CPD-2016-0066, adherida al proyecto RTA2014-00061-C03-01 titulado “Prevención y control de virosis emergentes de vid en España”.

*A mi tío Pepe, madre y hermanos*

*“Los ganadores son aquellos que no se rinden nunca;  
los perdedores, los que ni siquiera lo intentan”*

## Agradecimientos

Quiero empezar la presente tesis agradeciendo a todas aquellas personas que han podido estar a mi lado durante esta larga travesía académica y personal.

Me gustaría comenzar agradeciendo a esas personas de las que he aprendido durante estos 5 años, tanto a nivel profesional como personal. Me refiero a mis directores de tesis Ana Belén Ruiz y Antonio Olmos. Quiero daros las GRACIAS (en mayúsculas) por todas las lecciones magistrales sobre virus fitopatógenos que me habéis dado, por esas largas reuniones, en las que tanto he aprendido y me he reído, por vuestra paciencia y sobre todo, por vuestra implicación en lo referente a este trabajo. Sin vosotros esto no hubiese sido posible. Han sido años de mucho trabajo y aprendizaje personal pero también han sido de muchas risas, abrazos y charlas amenas. Por todo ello quiero que sepáis que os tendré siempre en mi corazón, porque más allá de ser mis directores de tesis, os considero mis amigos sin lugar a duda.

Y bueno, como voy a olvidarme de mi fiel escudera de laboratorio Celia Canales Quilis, esa persona que ha estado siempre disponible en el laboratorio, y que siempre que he necesitado ayuda no ha dudado nunca en echarme una mano. Muchísimas gracias por estar ahí y por tus innumerables PCRs, geles, clonaciones, que han servido para que todo esto sea posible. Quiero que sepas que te aprecio un montón tanto a nivel personal como profesional y que creo que si sigues como vas podrías llegar muy lejos. No cambies ;)

PD: A ver si te animas y la próxima tesis es la tuya.

Bueno, bueno, bueno, como iba a olvidarme de mi "Consuelin". Si me olvido de mencionarte me matas seguro. Bueno, lo primero agradecerte la ayuda prestada en el laboratorio, sin tu ayuda ese laboratorio estaría 24/7 manga por hombro. Lo segundo, y en realidad es lo que más te agradezco, han sido todos los consejos que me has dado (y me sigues dando) durante todos estos años, los cuales me han servido y sirven para mejorar como persona. De verdad, GRACIAS.

Pero bueno, no todo va ser agradecer a los virólogos de frutales del IVIA, también tengo que agradecer a los bacteriólogos; esos vecinos/jefes/compañeros/amigos que me han ayudado también de una forma o de otra durante esta travesía. Gracias a Ester Marco, Silvia Barbé e Inmaculada Navarro por haber estado siempre disponible para cualquier cosa que necesitase, gracias por escucharme, y gracias por vuestros consejos y recomendaciones.

No me olvido de mi compañera de horarios de tarde del IVIA, y bióloga favorita, Adela Monterde. Gracias por ayudarme SIEMPRE en todo aquello que he necesitado en el laboratorio y por enseñarme desde el ejemplo a hacer siempre las cosas de la manera más correcta. Ah! y gracias también por no reñirme cuando se me olvidaba sacar el autoclave, te juro que no me va a volver a pasar. Y que sepas que más personas como tú hacen falta en este planeta.

Tampoco me olvido del resto de bacteriólogos y compañeros de almuerzos. Gracias a Mario Herrero por ser mi mano derecha en lo referente a mis trabajos con bacterias, sin ti no hubiésemos avanzado tanto. Aprovecho además para desearte todo lo mejor en tu nueva etapa predoctoral. Gracias a Miriam, Irene, Marisa, Itziar, Nerea e Inma, por hacerme más divertida y amena mi estancia en el IVIA por vuestras risas y vuestro apoyo personal, el cual ha significado mucho para mí.

Y bueno ya ahora toca el siguiente bloque de agradecimientos a aquellos que se encuentran fuera de las inmediaciones del IVIA, me refiero a mi FAMILIA, tanto la que me ha tocado por consanguinidad como aquella que he elegido.

Quiero empezar dándole las gracias al "Sr." Juan José San Juan Cortinas, al que más que amigo lo considero un hermano, eso significa que la tesis también te la he dedicado a ti. Muchas gracias por ayudarme siempre en los momentos más duros de mi vida, te debo mucho. La verdad es que has hecho tanto por mí que necesitaría varias vidas para devolverte todos los favores que me has hecho. También debo de agradecer a tu Madre Fina y a tu tía Carmen. Ellas han formado indirectamente parte de todo esto también. Os deseo lo mejor a los tres. Os quiero mucho.

No me olvido de mi familia de sangre, de mis hermanitos queridos María Yanosky y Félix Javier; que siempre han confiado en mí ciegamente y me han apoyado de una forma o de otra. Agradezco por encima de todo a mi madre por escucharme y aconsejarme siempre que lo he necesitado. Gracias por soportar todas mis chapas sobre virus, bacterias, PCRs entre otras cosas. Gracias por ser mi apoyo constante, por enseñarme a no rendirme y a seguir adelante. Gracias por enseñarme que lo más importante es levantarse después de una caída, aprendiendo de los errores. Y gracias por ser siempre tan optimista y por haber confiado en mí en todo momento. Te quiero madre!

Y bueno, a mi Lore le tengo que dedicar unas palabras también, en primer lugar debo agradecerte la paciencia que has tenido soportando todo esto a mi lado; gracias por escucharme siempre que hablaba de mis "movidas" a pesar de que no entendieras ni papa... bueno al final entre la pandemia y mi tesis, sabes ya casi más que yo sobre PCRs.

Gracias por aconsejarme sobre cuál es la mejor decisión, eso te lo agradezco muchísimo, tu perspectiva siempre me ilumina; como dice una canción de Leiva "*Mientras todo se prendía tú estabas allí mismo y escuché cómo decías 'abrázame, todo vuelve a ser fácil'*".

Y bueno, me falta añadir a los "delincuentes"/ "primos" que tengo como amigos. Voy a empezar por el Dr. Irving Cancino o también conocido como Mr. NGS. Gracias por haberte cruzado en mi camino primo, la verdad es que no me hubiese imaginado esta etapa sin esos debates profundos sobre secuenciación mientras nos tomamos una cerveza los viernes. También agradezco al Ingeniero robótico ensambla grúas Fabricio Guevara, gracias primo por ser un soporte vital en esta etapa, sin nuestras quedadas mi cerebro ya hubiese colapsado, gracias por ser esa vía de escape mental tan necesaria.

También agradezco al Dr. Francisco Xavier Silva por no haberme incluido en los agradecimientos de su tesis. No, ahora en serio, gracias primo por formar parte de mi vida, aunque ahora no estés en Europa, siempre estarás en nuestros corazones y en cada Beer-Pong que juguemos.

También agradecer al Médico, y no Dr., Cristian M., gracias por suministrarme los medicamentos necesarios para escribir esta tesis... hahahaha que no, que estoy bromeando, gracias por esos momentos de risa y de improvisación que de no ser por ti no existirían.

No me olvido del resto de delincuente, Mr Khalid (alias El Yuku), Serena (alias La Belina), María Amparo (alias La MaraTruca), Silvia (alias La IaIa), Agata (alias La Mixu) ¿que os voy a decir? Pues que os quiero! Creo que con eso resumo todo lo que siento por mis delincuentes favoritos. Y no me olvido de la futura Dra. Marina Fuertes, solo puedo decir, ánimo que de esto se sale.

*PD: Si me ha faltado alguien por incluir en los agradecimientos es simplemente porque se me ha olvidado, pero no porque no te quiera, sino porque quiero acabar esto ¡ya! y no quiero seguir escribiendo más, pero que te quiero también! guap@!*

<b>RESUMEN</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
1.1 El cultivo de la vid ( <i>Vitis vinifera</i> L.)	16
1.2. Enfermedades de la vid	20
1.3. Virosis de la vid	22
1.4. Epidemiología y control de las virosis de la vid	32
1.5. Virosis emergentes de la vid	36
1.5.1. Grapevine Pinot gris virus	38
1.5.2. Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	42
1.5.3. Grapevine asteroid mosaic associated virus	45
1.5.4. Grapevine vein clearing virus	47
1.5.5. Grapevine virus E y Grapevine virus F	50
1.5.6. Grapevine virus T	52
1.5.7. Grapevine red blotch virus	53
1.6. Implementación de nuevas técnicas moleculares en el diagnóstico de virus de la vid.	56
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>61</b>
2.1 Justificación	62
2.2 Objetivos	62
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>64</b>
3.1 Material vegetal	65
3.2 Ensayos con vectores de transmisión	67
3.2.1 Adquisición	67
3.2.2 Transmisión	68
3.3 Preparación de extracto crudo y purificación de ácidos nucleicos	69
3.4 Secuenciación	70
3.4.1 Secuenciación Sanger	70
3.4.2 Secuenciación masiva	73
3.5 Cultivo y transformación de <i>Escherichia coli</i>	75
3.6 Detección de virus de vid	76

<b>3.7 Alineamiento de secuencias y análisis filogenéticos</b>	<b>79</b>
<b>3.8 Diseño de cebadores y sondas TaqMan de detección</b>	<b>79</b>
<b>3.9 Generación de rectas patrón para la cuantificación mediante RT-PCR y PCR</b>	<b>80</b>
<b>3.10 Diseño de RT-PCR convencional y qPCRs en tiempo real basadas en sondas TaqMan</b>	<b>82</b>
3.10.1 Detección de GAMaV	82
3.10.2 Detección de GPGV	83
3.10.3 Detección de GRLDaV	84
<b>3.11 Validación de los métodos de PCR en tiempo real desarrollados</b>	<b>85</b>
3.11.1 Sensibilidad analítica	85
3.11.2 Especificidad y selectividad analítica	85
3.11.2.1 Detección de GPGV	85
3.11.2.2 Detección de GRLDaV	86
3.11.3 Repetibilidad y reproducibilidad	86
<b>3.12 Aislamiento de partículas virales</b>	<b>87</b>
<b>3.13 Microscopía electrónica de transmisión</b>	<b>88</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>90</b>
<b>4.1 Búsqueda de virosis emergentes de vid en España</b>	<b>91</b>
4.1.1 Análisis del viroma de la vid mediante HTS	91
4.1.2 Evaluación del estado sanitario en viñedos amparados bajo D.O.	94
4.1.3 Discusión	96
<b>4.2 Grapevine asteroid mosaic virus</b>	<b>99</b>
4.2.1 Caracterización molecular de GAMaV	99
4.2.2 Desarrollo de un método de detección específico para GAMaV	103
4.2.3 Discusión	105
<b>4.3 Grapevine Pinot gris virus</b>	<b>106</b>
4.3.1 Caracterización molecular de GPGV	106
4.3.2 Desarrollo de un método de detección mediante RT-PCR en tiempo real para GPGV	111
4.3.2.1 Diseño de cebadores y sonda	111
4.3.2.2 Detección de GPGV mediante RT-PCR en tiempo real	111
4.3.2.3 Evaluación del efecto del control interno sobre la detección de GPGV	112
4.3.2.4 Validación del método de detección basado en RT-PCR en tiempo real	113
4.3.2.5 Aplicación de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real para la detección de GPGV	117
4.3.2.6 Determinación del título viral de GPGV en <i>Colomerus vitis</i>	117
4.3.3 Discusión	120

<b>4.4 Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus</b>	<b>124</b>
4.4.1 Caracterización molecular de GRLDaV	124
4.4.2 Desarrollo de un método de detección mediante PCR en tiempo real para GRLDaV	126
4.4.2.1 Diseño de cebadores y sonda	126
4.4.2.2 Detección de aislados de GRLDaV mediante PCR en tiempo real	127
4.4.2.3 Validación del método de detección basado en PCR en tiempo real	128
4.4.2.4 Aplicación de la PCR en tiempo real para la detección de GRLDaV	131
4.4.2.5 Detección y cuantificación de GRLDaV en cochinillas	131
4.4.3 Discusión	134
<b>4.5 Identificación de un virus de la familia <i>Mymonaviridae</i> presente en vides con sintomatología de etiología desconocida</b>	<b>137</b>
4.5.1 Caracterización de penicillimonavirus gammaplasmapara	137
4.5.1.1 Detección de RNAs de hebra negativa relacionados con el orden Mononegavirales	137
4.5.1.2 Análisis filogenético de <i>Penicillimonavirus gammaplasmapara</i> y la secuencia C-II	143
4.5.1.3 Presencia del contig C-II en otras BioSamples infectadas con <i>Plasmopara viticola</i> lesion associated mononegambi virus 3 ( <i>Penicillimonavirus gammaplasmapara</i> )	148
4.5.2 Aislamiento de partículas virales asociadas a <i>Penicillimonavirus gammaplasmapara</i>	151
4.5.4 Asociación de <i>Penicillimonavirus gammaplasmapara</i> a hongos patógenos de la vid	154
4.5.5 Discusión	155
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>160</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>164</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>178</b>
8.1 Publicaciones asociadas a la presente tesis doctoral	179
8.2 Base de datos	207

## Resumen

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una de las especies vegetales más susceptibles de padecer infecciones virales. En Europa y España, solo cinco especies virales (GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-3 y GFkV), de las treinta y una patógenas de la vid, se encuentran bajo restricción legislativa. Algunos de estos son virus emergentes no contemplados en la legislación, siendo GPGV, GAMaV, GRLDaV, GVE, GVF, GVT, GRBV y GVCV las principales especies de virus emergentes que pueden constituir una amenaza para los cultivos españoles. Por tanto, el objetivo general de la presente tesis es conocer la situación de las principales virosis emergentes de vid en España y desarrollar herramientas de diagnóstico que puedan implementar programas de prevención temprana, selección sanitaria, certificación y erradicación. Los resultados de la búsqueda de virosis emergentes, realizada en diferentes años, denominaciones de origen y variedades de vid, muestran que: (1) virus como GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GFkV, GFLV y GRSPaV siguen teniendo una presencia destacada en los viñedos españoles; (2) se han detectado, con prevalencias bajas, y solo en las denominaciones de origen (D.O.) Utiel-Requena y Manchuela, los virus emergentes GPGV y GAMaV, habiendo sido este último detectado por primera vez en España en este estudio; (3) no ha sido detectada la presencia de los virus GVT, GVE, GVF, GRBV, GVCV y GRLDaV.

La caracterización genética de los virus emergentes detectados en España ha demostrado que: (1) algunos aislados españoles de GPGV presentan un nuevo polimorfismo, no descrito hasta ahora, que afecta a la proteína de movimiento (MP); (2) existe una alta diversidad genética en los aislados españoles, lo cual sugiere la introducción por múltiples vías de este virus en las D.O. Utiel-Requena y Manchuela; y (3) la caracterización genética de los aislados GAMaV españoles evidencia que estos difieren del resto de los aislados virales descritos en otras

## *Resumen*

partes del mundo, sugiriendo por tanto que la introducción de este virus en España no es reciente.

Adicionalmente, se han desarrollado tres nuevos métodos de detección, uno basado en PCR convencional para la detección de GAMaV y dos basados en PCR en tiempo real para la detección y cuantificación absoluta de GRLDaV y GPGV, los cuales han sido aplicados con éxito para el diagnóstico de los tres virus tanto en plantas de vid como en sus posibles vectores de transmisión. Estos nuevos métodos de detección constituyen herramientas útiles para abordar futuros estudios epidemiológicos y prevenir la dispersión de estos patógenos en España y en otros territorios del mundo. Y, por último, se ha identificado por primera el genoma completo del micovirus penicillimonavirus gammaplasmopara, asociado a una nueva sintomatología de vid de etiología desconocida. Los estudios de caracterización molecular y aislamiento de partículas virales de esta especie viral sugieren que podría tratarse del primer virus bipartito de la familia *Mymonaviridae*.





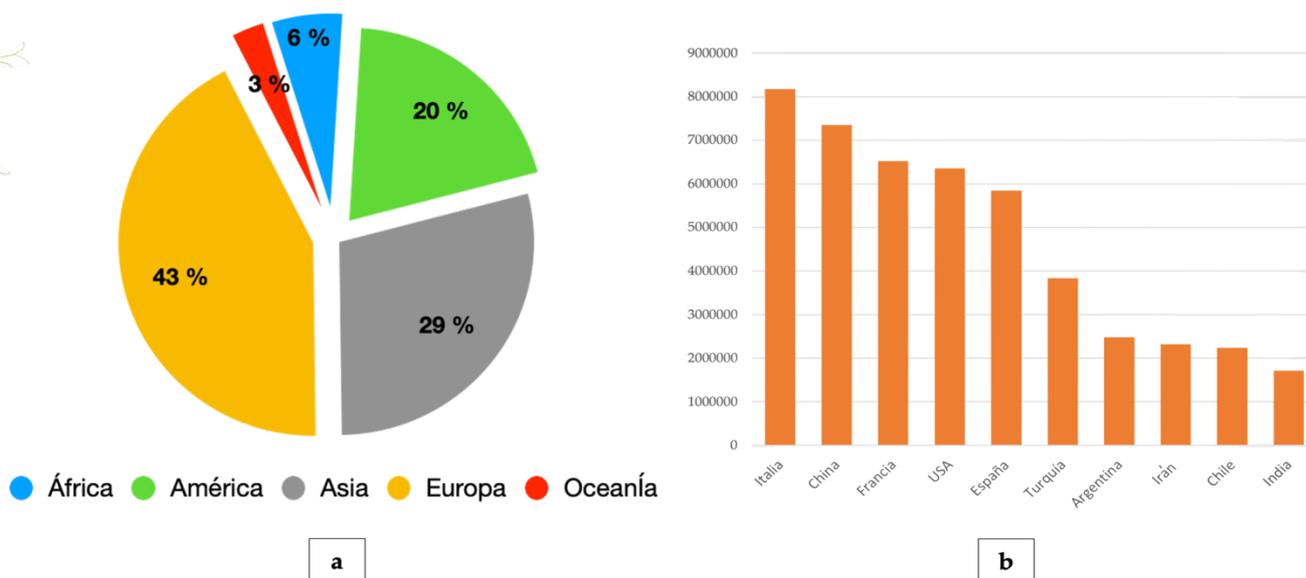
# 1. Introducción

## 1.1 El cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.)

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una planta leñosa trepadora perteneciente a la familia *Vitaceae* que puede alcanzar hasta treinta metros de altura en condiciones silvestres, aunque en cultivo (viñedo) no llega a sobrepasar los dos metros de altura. Su fruto, la uva, es una baya que crece en las ramas o sarmientos de la planta en forma de racimo y puede presentar coloraciones tintas o verdosas. El hábitat común de esta planta se sitúa en regiones de climas templados, donde las temperaturas bajas permiten un periodo de dormancia, reposo invernal o vegetativo en la planta y las temperaturas más altas el levantamiento de este reposo vegetativo, la brotación y la fase de crecimiento. Aunque el cultivo de la vid es originario de Asia Menor y Oriente Medio, los griegos y los romanos desarrollaron la viticultura aumentando la tecnología y el conocimiento de la producción del vino, expandiéndolo por Europa. En la actualidad, el cultivo de la vid representa una importante fuente de ingresos para la economía mundial. Las prácticas culturales de esta planta están fuertemente enraizadas en la cultura de muchos países, principalmente los europeos. Actualmente, la superficie total de vid cultivada en todo el mundo se sitúa en torno a los 6.9 millones de hectáreas (International Organization of Vine and Wine, 2019) lo que revela la importancia agronómica y económica de este cultivo. La mayoría de los cultivos de vid se localizan en Europa, siendo esta responsable del 42% de toda la producción mundial de uva, seguida de Asia (29%), América (20%), África (6%) y Oceanía (3%) (FAO, 2020).

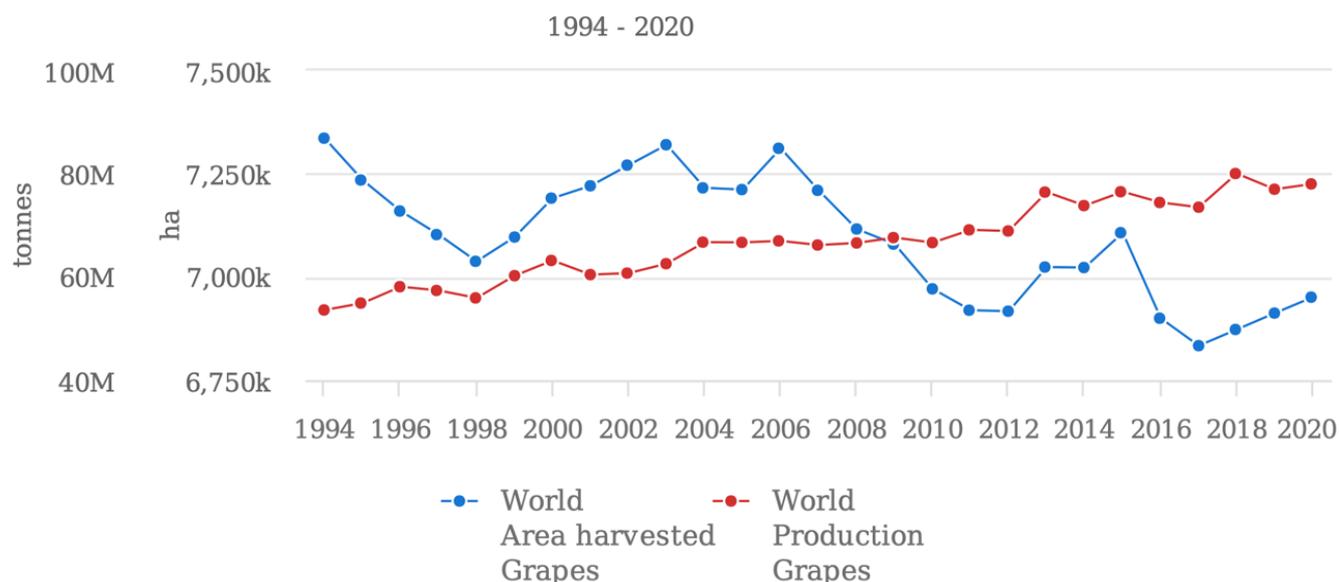
Según el promedio de producción de uva entre 1994 y 2020, los diez principales países productores de uva son Italia, China, Francia, Estados Unidos, España, Turquía, Argentina, Irán, Chile y Sudáfrica (Figura 1) (FAO, 2020).





**Figura 1. a.** Producción de uva por continente representada en porcentaje de la producción promedio en toneladas entre los años 1994 y 2020. **b.** Producción de uva (toneladas) de los principales países productores. Promedio 1994-2020. Gráficos realizados a partir de datos FAOSTAT de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).

Desde 1994 hasta 2020, la producción mundial de uva ha aumentado, pasando de 54.083.602 toneladas a 78.034.332, mientras que la superficie cosechada ha disminuido, pasando de 7.425.871 hectáreas a 6.950.930 (Figura 2). Según los últimos análisis realizados por la consultora *Mordor Intelligence Organization*, especializados en el estudio y seguimiento de mercados mundiales, el valor de mercado del sector de la uva se valoró en 167.900 millones de dólares americanos en 2018 y se estima que alcanzará un valor de 254.290 millones de dólares americanos en 2024 (Mordor, 2019). Estos datos revelan que hoy en día el cultivo de la vid sigue siendo un sector clave a nivel mundial, el cual se encuentra en pleno crecimiento.

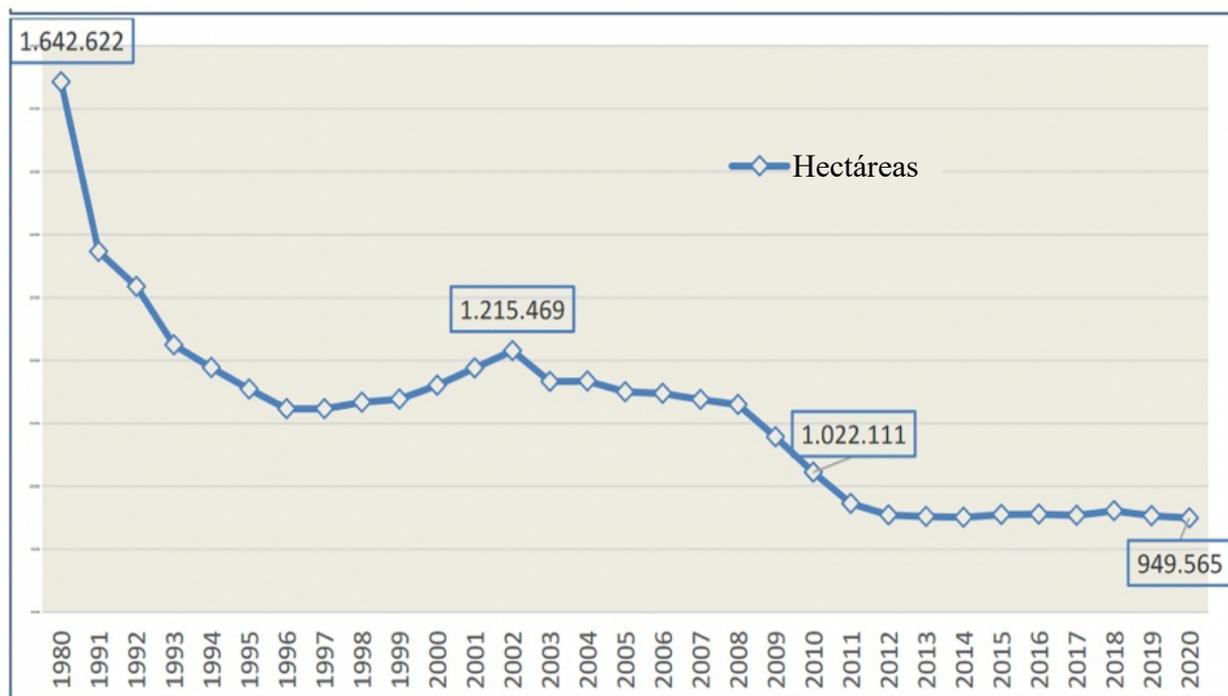


**Figura 2.** Producción en millones de toneladas (línea azul) y superficie cosechada en miles de hectáreas (línea roja) de vid a nivel mundial entre el periodo 1994-2020. Fuente: FAOSTAT de la Organización De Las Naciones Unidas Para La Alimentación y la Agricultura (FAO).

La vid es un cultivo que aborda diferentes tipos de mercado. Su fruto se puede consumir tanto de manera cruda como procesada (uva de mesa, pasas o vino), lo que permite que pueda ser utilizado como materia prima en diferentes sectores. La uva es muy valorada por sus propiedades beneficiosas para la salud, debido principalmente a los altos niveles de antioxidantes que la componen (Yang & Xiao, 2013). Además, esta fruta tiene un alto contenido en vitaminas (especialmente vitaminas del grupo B), azúcares y agua (70-80%), lo que la convierte en una perfecta fuente de energía. En este sentido, la uva es parte fundamental de la dieta y cultura mediterránea y es una fruta muy utilizada en todo el mundo.

Las uvas también se utilizan para preparaciones medicinales dado su alto contenido en flavonoides, que tienen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, antivirales, cardioprotectoras, neuroprotectoras y hepatoprotectoras (Georgiev *et al.*, 2014).

Además de esto, la uva tradicionalmente se ha utilizado como materia prima a nivel industrial para la producción de vino. De hecho, más de la mitad de la producción mundial de uva se fermenta en vino o productos similares destilados. La *International Organisation of Vine and Wine* (OIV) estimó el consumo mundial de vino en 2019 en 244 millones de hl y el valor del mercado mundial de exportación de vino en 31.800 millones de euros (*International Organisation of Vine and Wine*, 2020). En España, según la última encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), la superficie de viñedo cultivada se situó en torno a las 957.844 hectáreas (MAPA, 2021a). Si se observa la evolución de superficie cultivada de la vid en España (Figura 3), se puede apreciar que desde los años 1980 hasta 2010, hubo una tendencia a la baja de la superficie cultivada de esta planta, pero a partir de año 2010 este descenso se ha ido estabilizando.



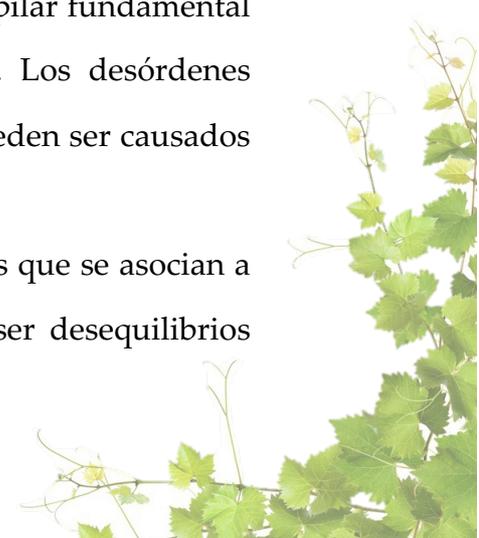
**Figura 3.** Superficie de vid cultivada en España desde 1989 hasta 2020 de acuerdo a datos suministrados por la Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivo de España (ESYRCE) del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España.

Sin embargo, a pesar de este descenso global en la superficie plantada de la vid, en la actualidad el sector viticultor en España representa un importante papel en la economía española, llegando a producir en el año 2021 más de 6.817.765 toneladas de uva (MAPA, 2021b), situándose como el tercer país del mundo con mayor producción en los últimos tres años (FAO, 2021). Según datos disponibles del MAPA, el sector vitivinícola generó más de 2.142,8 millones de euros, aportando el 8,02% de toda la producción vegetal y casi el 4,8% de la producción de toda la rama agraria (incluye producción vegetal y animal); además se estima que la mano de obra que genera el cultivo del viñedo se aproxima a los 18 millones de jornales, aportando de esta manera ingresos indirectos al país (MAPA, 2021c). En resumen, el cultivo de la vid es un sector muy valioso para la industria agrícola española, y representa una sustancial fuente de recursos económicos y culturales para el país, por lo que mantener sanos los viñedos es de crucial importancia para mantener la estabilidad del sector.

## **1.2. Enfermedades de la vid**

En las plantas, aparecen enfermedades como resultado de una disfunción vegetativa que conlleva la aparición de síntomas, que son la consecuencia de alteraciones en la biología de la planta, y que se traduce en la disminución de la calidad de la fruta y/o la producción (Llácer *et al.*, 1996). Como ocurre en muchos otros cultivos, las patologías que afectan a los viñedos pueden ocasionar considerables daños, que implican elevadas pérdidas económicas, ecológicas e incluso culturales, llegando a ser en algunos casos irreparables. Por ello, la prevención, el control y manejo de estas enfermedades es un pilar fundamental en la producción de uva de muchas regiones del mundo. Los desórdenes vegetativos que acaban traduciéndose en una enfermedad pueden ser causados por factores bióticos o abióticos.

Las enfermedades de origen abiótico o fisiopatías son aquellas que se asocian a trastornos causados por entidades no vivas, como pueden ser desequilibrios



nutricionales, estrés ambiental o toxicidad química. Las enfermedades de origen biótico son aquellas causadas por agentes vivos o patógenos, como pueden ser los hongos, oomicetos, bacterias, virus y viroides. Es importante destacar que las enfermedades causadas por factores bióticos son las de mayor importancia fitopatológica debido a su severidad, rápida dispersión y difícil control (Llácer *et al.*, 1996).

Adicionalmente, en el caso de la vid, se debe considerar que las plantaciones de este cultivo son muy longevas y además que se multiplican vegetativamente, lo que favorece la acumulación y proliferación de patógenos. Según el último listado de enfermedades que afectan a la vid, publicado por la Sociedad Americana de Fitopatología (Wilcox *et al.* 2015) y actualización realizada por Martelli (2017), el número de patologías descritas hasta el momento que afectan a este cultivo asciende a ochenta y cuatro tipos diferentes; en dicho listado se incluyen todas aquellas enfermedades asociadas o causadas por bacterias (11 especies), hongos (8 especies) y oomicetos (40 especies); nematodos (6 especies); virus y viroides (35 especies) y fisiopatías (5 desórdenes abióticos). Se puede apreciar que la mayoría de las patologías que afectan a la vid se asocian principalmente a hongos, virus y viroides. De hecho, de acuerdo a una reciente publicación sobre el clima, plagas y enfermedades de la vid, basada en una encuesta mundial realizada a expertos en materia fitopatológica, las enfermedades más comunes e importantes que afectan a este cultivo son las de origen fúngico, seguidas por las de tipo vírico (Bois *et al.*, 2017).

Las enfermedades fúngicas, en concreto el mildiu y el oídio (asociados a los hongos de las familias *Erysiphales* y *Oomycetes*), la podredumbre gris de la vid (asociada a *Botrytis cinerea*) y enfermedades de la madera (asociadas a hongos xilófagos) son las patologías de mayor relevancia y frecuencia; las enfermedades víricas más importantes son las que se asocian a cambios en la coloración y enrollado de las hojas (Almeida *et al.*, 2013) y a la disminución de la calidad de los frutos (Andret-Link *et al.*, 2004).

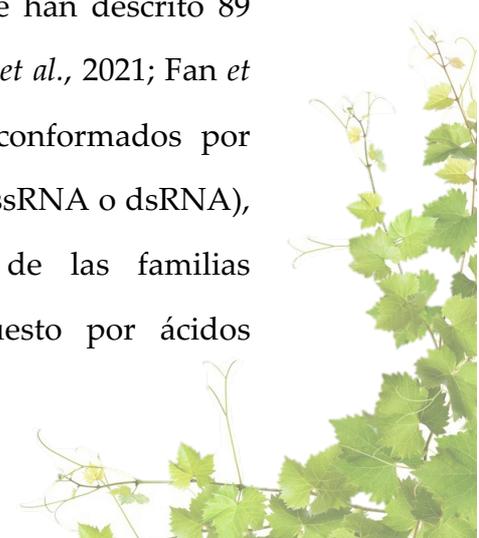
De hecho, en el caso de la enfermedad del enrollado de la hoja de la vid, existen precedentes históricos en Estados Unidos donde entre los años 70 y 90 las pérdidas totales asociadas a esta enfermedad se situaron entre el 5% y el 9% de toda la producción (Goheen, 1970; Duffus, 1977).

### 1.3. Virosis de la vid

Los virus son agentes infecciosos que se encuentran ligados de manera obligada a su hospedador, debido a que su replicación depende de la maquinaria molecular de la célula a la cual infectan. Cuando un virus altera el funcionamiento celular de una planta, a nivel de replicación, transcripción y/o expresión de sus genes, este puede provocar alteraciones fisiológicas o desórdenes vegetativos que se traducen en la planta en forma de enfermedad, ocasionando diferentes tipos de daños en el cultivo (Hull, 2013).

Como ya se ha mencionado, los virus son el segundo grupo de patógenos más importantes de la vid debido a: (i) el elevado número especies que la infectan y (ii) el impacto socioeconómico que ocasionan. Clásicamente, las enfermedades virales que afectan a la vid se han clasificado en cuatro síndromes principales, que incluyen: (i) la degeneración infecciosa y decaimiento (*infectious degeneration, declive*), (ii) el enrollado de la hoja (*grapevine leafroll complex, GLC*), (iii) el complejo de la madera rizada (*rugose wood complex, RWC*) y (iv) el jaspeado (*fleck*).

Además, la vid es una de las especies vegetales más susceptibles de padecer infecciones virales (Naidu *et al.*, 2014). Hasta el momento se han descrito 89 especies diferentes de más 38 géneros (Fuchs, 2020; Rwahnih *et al.*, 2021; Fan *et al.*, 2021a,b). La mayoría de estos virus tienen genomas conformados por moléculas de ácidos ribonucleicos de simple o doble cadena (ssRNA o dsRNA), aunque existen algunos virus descritos recientemente, de las familias *Geminiviridae* y *Caulimoviridae*, cuyo genoma está compuesto por ácidos



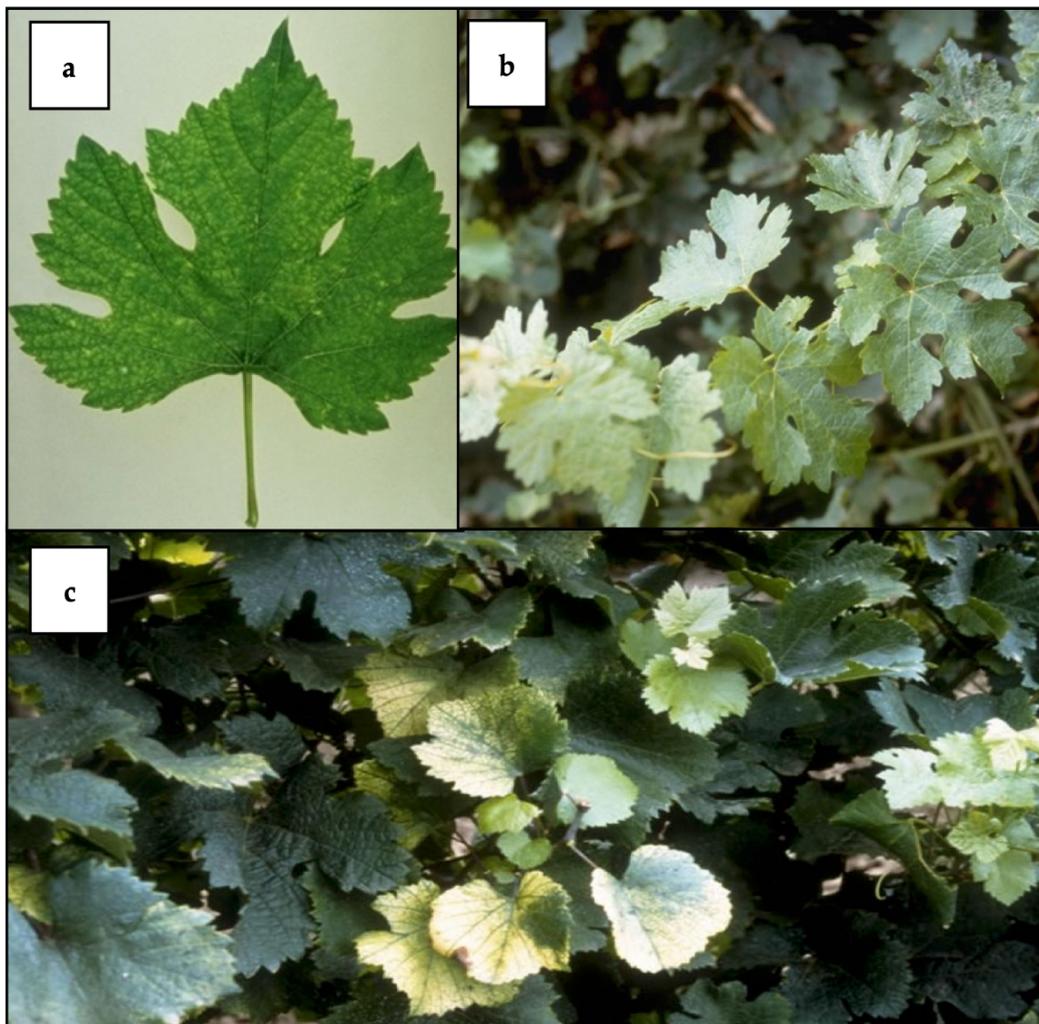
desoxirribonucleicos (DNA) de simple y doble cadena (ssDNA y dsDNA) respectivamente (Tabla 1). Otra característica destacable de los virus que infectan a la vid es el hecho de que la mayoría de las especies que infectan a esta planta lo hacen de manera específica, es decir, son virus especializados en parasitar solo a especies de plantas del género *Vitis*; en menor número también se pueden encontrar otras especies víricas más generalistas.

Algunos virus como grapevine fanleaf virus (GFLV), arabis mosaic virus (ArMV), grapevine red blotch virus (GRBV), grapevine vein clearing virus (GVCV), grapevine roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV), grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3, 4 y 7 (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-7) y grapevine fleck virus (GFkV) están asociadas claramente a enfermedades importantes: el entrenudo corto infeccioso, la mancha roja (*red-blotch*), el enrollado de la hoja (*leafroll*), el aclaramiento de nervaduras (*vein clearing*), la deformación de la hoja moteada (*leaf mottling deformation*), las decoloraciones de la hoja (*leaf discolorations*), la madera rizada (*rugose wood*), y el jaspeado (*fleck*), respectivamente (Figuras 4-7).

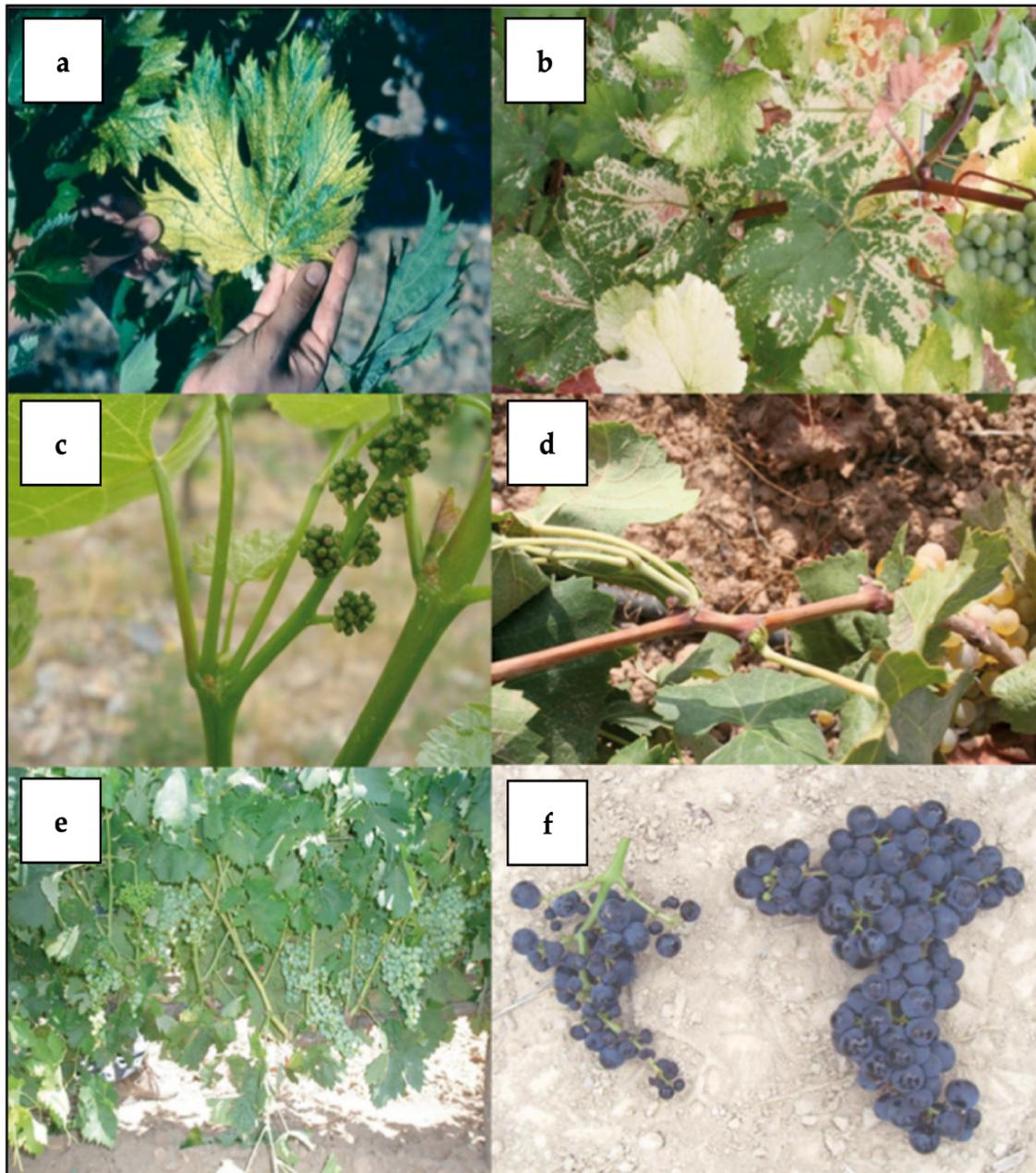
En la viticultura española, tienen una presencia destacada los virus GLRaV-1, GLRaV-3, GFkV, GFLV y grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) (Barrios Sanroma *et al.*, 2004). Estas virosis son de tal importancia fitosanitaria que incluso algunos de estas especies virales, como son GFLV, GFkV, GLRaV-1 y GLRaV-3, junto con el virus del mosaico del arabis (ArMV), se encuentran bajo restricción legislativa a nivel nacional y europeo, y están incluidas en el reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de vid, según el Real Decreto 208/2003 (Orden APA/2474/2006; Directiva UE 2002/11/CE).

Sin embargo, no siempre solo una especie de virus es la responsable de una enfermedad en vid, ya que las infecciones múltiples son muy comunes en este tipo de plantas tan domesticadas (Basso *et al.*, 2017; Mannini & Digiario, 2017).

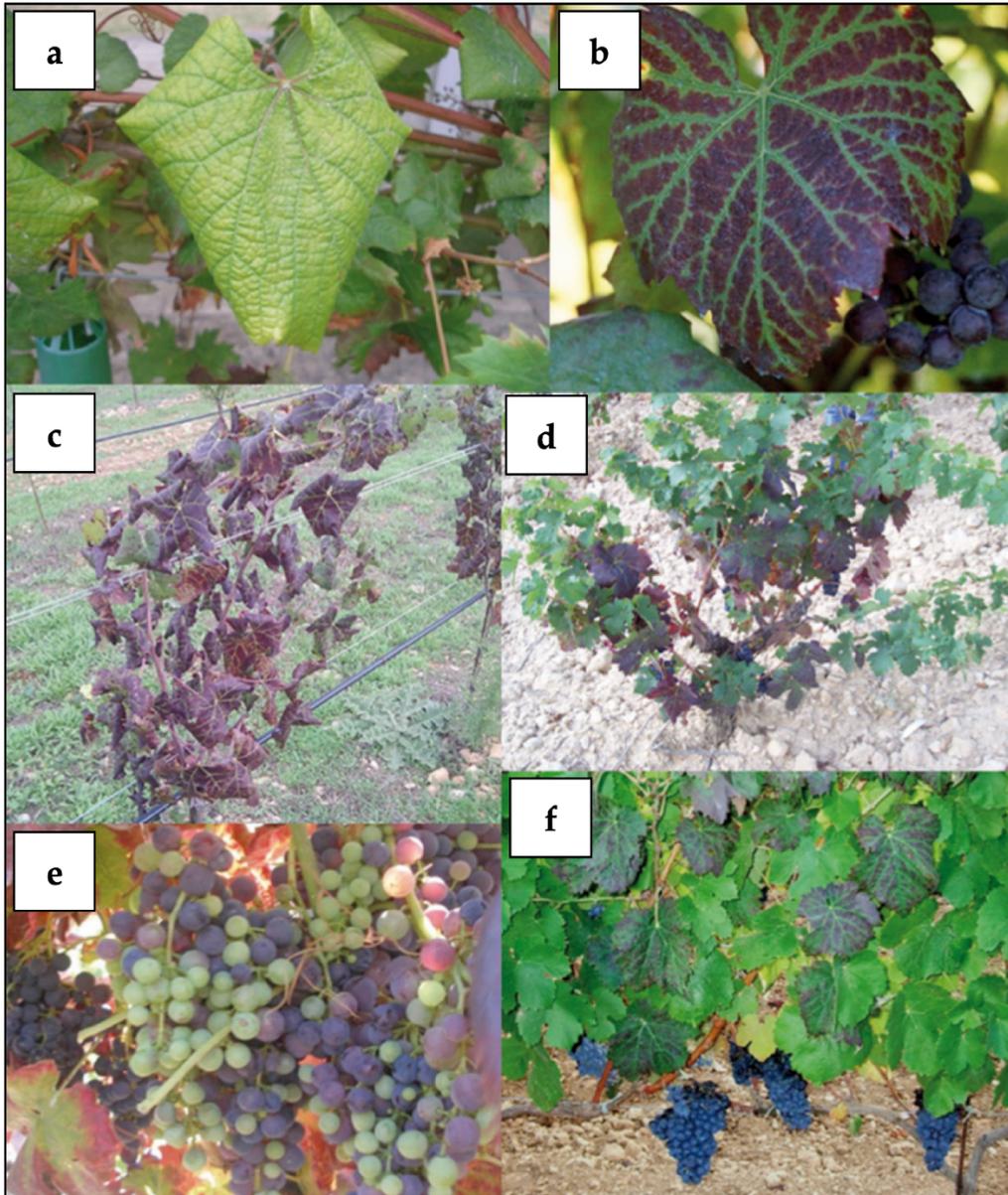
Además, existen muchos otros virus que han sido descritos infectando vid, que no están asociados claramente a algún tipo de enfermedad o trastorno vegetativo evidente, en muchos casos se desconoce el cómo se transmiten estos virus de una planta a otra e incluso algunos de ellos aún no tienen siquiera una asignación taxonómica definida (Fuchs, 2020).



**Figura 4.** Síntomas asociados al virus del mosaico del arabis (ArMV) en vid (*Vitis vinifera* L.) en hoja (a) y síntomas en dos variedades diferentes de vid: Feteasca regale (b) y Tamioasca romanesca (c). Fuente EPPO Global database.

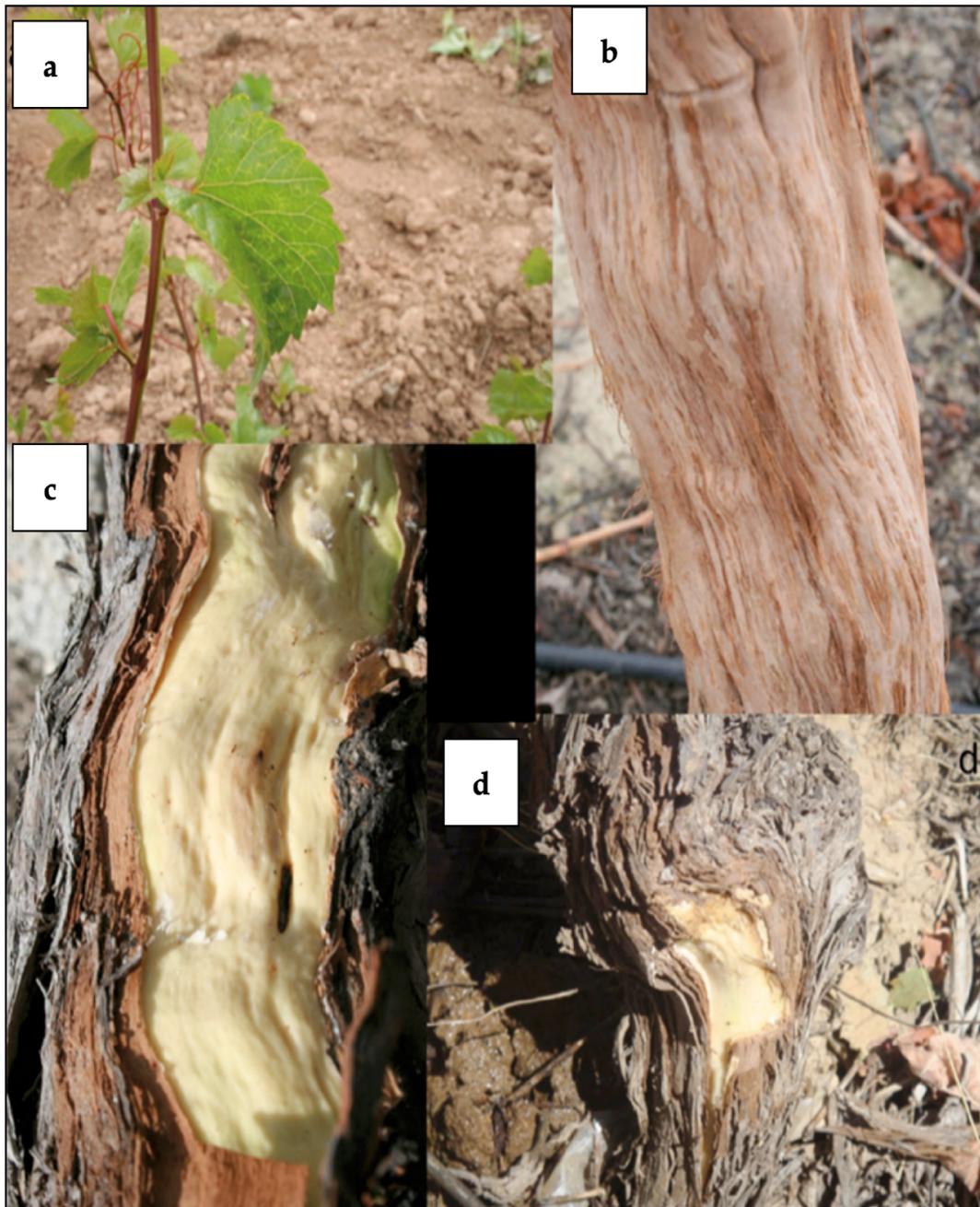


**Figura 5.** Síntomas asociados al virus del entrenudo corto infeccioso de la vid y degeneración infecciosa, grapevine fanleaf virus (GFLV): **a-b**, síntomas de clorosis en hoja de la vid; **c-d**, síntomas en ramas donde se aprecian los dobles nudos, fascias y el entrenudo corto; **e-f**, síntomas en racimos, disminución del tamaño de los racimos de la vid. Fuente de las fotos: Ayllón *et al.*, (2018).



**Figura 6.** Síntomas asociados a virus del enrollado (GLRaV-1 y GLRaV-3) en hojas y bayas de vid: **a**, enrollado y acartonado en hoja; **b**, hoja con síntomas de enrojecimiento en lámina foliar y nervaduras principales verdes; **c**-, enrollado clásico en hojas y diferentes tipos de coloraciones rojizas en la planta; **e**, maduración irregular en bayas; y **f**, síntomas de enrojecimiento en hojas sin alteración en las bayas. Fuente de las fotos: Ayllón *et al.*, (2018).





**Figura 7.** Síntomas asociados a grapevine fleck virus (GFkV) en hojas y tallo de la vid (*Vitis rupestris* S.): **a**, aclaramiento de nervaduras centrales; **b-d**, troncos de vid descortezados donde se puede apreciar el complejo de madera rizada, conformado por depresiones heterogéneas a lo largo del tronco. Fuente de las fotos: Ayllón *et al.*, (2018).

**Tabla 1.** Especies de virus descritos infectando *Vitis vinifera* L. hasta la fecha (Fuchs, 2020; (Rwahnih *et al.*, 2021; Fan *et al.*, 2021a,b).

Familia <sup>a</sup>	Género <sup>a</sup>	Especie <sup>a</sup>	Genoma	Vector <sup>b</sup>	Enfermedad <sup>c</sup>			
<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Potexovirus</i>	<i>Potato virus X (PVX)</i>		Desconocido	Desconocida			
	<i>Fivirus</i>	<i>Grapevine Kizil Sapak virus (GKSV)</i>			Desconocida			
		<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)</i>			Madrera rizada			
	<i>Foveavirus</i>	<i>Grapevine virus T (GVT)</i>			Necrosis interna en las bayas			
		<i>Grapevine berry inner necrosis virus (GINV)</i>			Deformación y moteado			
		<i>Grapevine Pinot gris virus (GPGV)</i>						
	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Vitivirus</i>			<i>Grapevine virus A (GVA)</i>	(+) ssRNA	Cochinillas	Rugosidad en la madera
					<i>Grapevine virus B (GVB)</i>			
					<i>Grapevine virus C (GVC)</i>			
					<i>Grapevine virus D (GVD)</i>			
<i>Grapevine virus E (GVE)</i>								
<i>Grapevine virus F (GVF)</i>								
<i>Grapevine virus G (GVG)</i>								
<i>Grapevine virus H (GVH)</i>								
<i>Grapevine virus I (GVI)</i>								
<i>Grapevine virus J (GVJ)</i>								
<i>Grapevine virus K (GVK)</i>								
<i>Grapevine virus L (GVL)</i>								
<i>Grapevine virus M ((GVM)</i>								
<i>Alfalfa mosaic virus (AMV)</i>	Áfidos	Mosaico amarillo						
<i>Bromoviridae</i>	<i>Anulavirus</i>	<i>Amazon lily mild mottle virus (ALiMMV)</i>		Desconocido	Desconocida			
	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i>			Áfidos	Desconocida		
		<i>Grapevine angular mosaic virus (GaMoV)</i>			Ninguno	Mosaico angular		
		<i>Grapevine line pattern virus (GLPV)</i>				Desconocida		
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Grapevine virus S (GVS)</i>	(-)ssRNA	Trips	Desconocida			
		<i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i>			Desconocida			

Introducción

Familia <sup>a</sup>	Género <sup>a</sup>	Especie <sup>a</sup>	Genoma	Vector <sup>b</sup>	Enfermedad <sup>c</sup>	
Caulimoviridae	Badnavirus	<i>Grapevine vein clearing virus</i> (GVCV)	DNA	Áfidos	Aclaramiento de venas	
		<i>Grapevine badnavirus 1</i> (GBV1)			Desconocida	
		<i>Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus</i> (GRLDaV)			Roditis discoloration	
Closteroviridae	Closterovirus	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV2)	(+) ssRNA	Desconocido	Enrollamiento /incompatibilidad	
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV1)		Cochimillas	Enrollamiento de hojas	
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV3)				
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 4</i> (GLRaV4)				
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 13</i> (GLRaV13)				
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 7</i> (GLRaV7)				
		<i>Grapevine endophyte endornavirus</i> (GEEV)				
Endornaviridae	Endornavirus	<i>Grapevine emaravirus A</i> (GEVA)*	(-)ssRNA		Moteado clorótico	
Fimoviridae	Emaravirus					
	Begomovirus	<i>Grapevine begomovirus A</i> (GBVA)		Mosca Blanca	Desconocida	
Geminiviridae	Grablovirus	<i>Grapevine red blotch virus</i> (GRBV)	DNA	Membrácidos	Mancha roja	
	<b>Sin asignar</b>	<i>Wild Vitis latent virus 1</i> (WV1)		Desconocido		
		<i>Grapevine geminivirus A</i> (GGVA)				
		<i>Temperate fruit-decay-associated virus</i> (TFDaV)				
	Luteoviridae	Enamovirus		<i>Grapevine enamovirus 1</i> (GEV1)	(+) ssRNA	Áfidos
Partitiviridae	Deltapartitivirus	<i>Grapevine cryptic virus</i> (GCV)	Desconocido			
Phenuiviridae	Rubodvirus	<i>Grapevine Garan dmak virus</i> (GGDV)	(-) ssRNA	Desconocido	Desconocida	
	Potyvirus	<i>Grapevine Muscat rose virus</i> (GMRV)	(+)ssRNA	Áfidos		
Reoviridae	Sin asignar	<i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV)	dsRNA	Saltamontes	Desconocido	
	Cheravirus	<i>Potato virus Y</i> (PVY)		Desconocido		Áfidos
Secoviridae	Fabavirus	<i>Grapevine Cabernet Sauvignon reovirus</i> (GCSV)	(+)ssRNA	Áfidos	Desconocida	
		<i>Apple latent spherical virus</i> (ALSV)				
		<i>Broad bean wilt virus</i> (BBMV)				
		<i>Grapevine fabavirus</i> (GFabV)				

Familia <sup>a</sup>	Género <sup>a</sup>	Especie <sup>a</sup>	Genoma	Vector <sup>b</sup>	Enfermedad <sup>c</sup>						
Tombusviridae	Nepovirus	<i>Artichoke Italian latent virus (AILV)</i>		Desconocido	Degeneración						
		<i>Arabis mosaic virus (ArMV)</i>		Nematodos							
		<i>Blueberry leaf mottle virus (BBLMV)</i>		Desconocido							
		<i>Cherry leafroll virus (CLRV)</i>									
		<i>Grapevine Anatolian ringspot virus (GARSV)</i>		Desconocido							
		<i>Grapevine Bulgarian latent virus (GBLV)</i>									
		<i>Grapevine deformation virus (GDeV)</i>									
		<i>Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)</i>									
		<i>Grapevine fanleaf virus (GFLV)</i>									
		<i>Grapevine Tunisian ringspot virus (GTRV)</i>									
		<i>Peach rosette mosaic virus (PRSM)</i>									
		<i>Raspberry ringspot virus (RpRSV)</i>									
		<i>Tobacco ringspot virus (TRSV)</i>									
		<i>Tomato ringspot virus (ToRSV)</i>									
<i>Tomato black ring virus (TBRV)</i>	Nematodos										
<i>Grapevine nepovirus A (GNA)*</i>											
<i>Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)</i>	Desconocida										
Tymoviridae		Sin asignar	<i>Carnation mottle virus (CarMV)</i>		Desconocido	Desconocida					
			<i>Tobacco necrosis virus D (TNV-D)</i>								
			<i>Grapevine Algerian latent virus (GALV)</i>								
			<i>Petunia asteroid mosaic virus (PAMV)</i>								
			<i>Blackberry virus S (BIVS)</i>				Saltamontes				
			<i>Grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV)</i>								
			<i>Grapevine-associated marafivirus (GaMV)*</i>				Desconocido				
			<i>Grapevine Syrah virus 1 (GSyV1)</i>								
			<i>Grapevine fleck virus (GFkV)</i>								
			<i>Grapevine redglobe virus (GRGV)</i>								
			Tombusviridae				Maraftivirus	<i>Maraftivirus</i>		Desconocido	Moteado y aclareamiento en nerviaduras
								<i>Maraftivirus</i>			Aclaramientos en nerviaduras
								<i>Maraftivirus</i>			Desconocida
	<i>Maraftivirus</i>							Moteado			
<i>Maraftivirus</i>	Desconocida										
<i>Maraftivirus</i>	Desconocida										

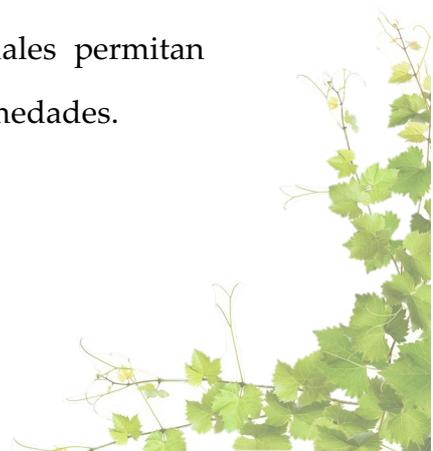
## Introducción

Familia <sup>a</sup>	Género <sup>a</sup>	Especie <sup>a</sup>	Genoma	Vector <sup>b</sup>	Enfermedad <sup>c</sup>	
Virgaviridae	<i>Gratyllivirus</i>	<i>Grapevine-associated tymo-like virus (GaTLV)</i>		Desconocido		
	<i>Tobamovirus</i>	<i>Grapevine virga-like virus (GVLV)</i>				
		<i>Tobacco mosaic virus (TMV)</i>				
		<i>Tomato mosaic virus (ToMV)</i>				
<i>Idaeovirus</i>	<i>Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)</i>	Desconocido		Estampado líneas amarillas		
	<i>Sobemovirus</i>					
	<i>Virtovirus</i>					
Sin asignar	<b>Sin asignar</b>	<i>Grapevine virus satellite (GV-Sat)</i>			Escarabajo	Desconocida
		<i>Grapevine Ajinashika virus (GAGV)</i>			Desconocido	
		<i>Grapevine labile rod-shaped virus (GLRSV)</i>				
		<i>Grapevine stunt virus (GSV)</i>	Saltamontes			

(a) Algunas de las asignaciones taxonómicas son temporales, pendientes de revisión por parte del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). (b) Algunos de los vectores se deducen por analogía con los vectores de otros virus del mismo género. (c) La mayoría de los síntomas de las enfermedades víricas no se pueden atribuir a una sola especie de virus, ya que las vides sintomáticas están predominantemente infectadas de forma mixta en el viñedo. \*Virus descritos en el año 2021 (Fan *et al.*, 2021a,b).

#### **1.4. Epidemiología y control de las virosis de la vid**

Los virus vegetales, al tratarse de parásitos obligados, una vez infectan una planta necesitan infectar a otras para prolongar su supervivencia temporal y espacial. Este proceso implica la necesidad de traspasar la pared celular que envuelve las células vegetales infectadas, salir e infectar a una nueva célula. Las formas más comunes de propagación que presentan los virus de vid son la propagación vegetativa (esquejes o injertos) y los vectores de transmisión, que adquieren el virus al alimentarse de una planta infectada, pudiendo transmitirlo al alimentarse de otra planta sana. Generalmente la propagación de material vegetal infectado es la principal responsable de la dispersión vírica a larga distancia, mientras que la transmisión a nivel local se reduce a vectores y a prácticas culturales (Martelli, 2017). Por ello, las principales medidas de control de enfermedades víricas de la vid se centran en la producción de material vegetal sano (libre de virus), destinado a propagación, y al control de los principales vectores de transmisión, todo ello mediante la aplicación del control integrado de enfermedades virales, el cual se basa en el uso de todas las medidas de control disponibles (físicas, químicas, biológicas y legislativas) enfocadas en reducir el impacto socioeconómico de la enfermedad viral en cuestión. Existen diferentes formas destinadas al control de virosis de la vid: (i) la detección precoz del agente causal o asociado a la enfermedad (ii) la implementación de patrones resistentes a salinidad, sequía, infección por nematodos y filoxera; (iii) el control de vectores; (iv) la aplicación de cuarentenas y criterios de certificación al material vegetal destinado a la propagación; y (v) la erradicación. Siendo la primera estrategia una de las más importantes para el control de las enfermedades. Por lo tanto, el diagnóstico temprano de las virosis de vid requiere de la disponibilidad de herramientas de detección que sean fiables y precisas, las cuales permitan adoptar medidas adecuadas de prevención y control de las enfermedades.





## *Introducción*

Los principales métodos de detección de virus de vid están basados en análisis moleculares, ensayos serológicos, pruebas biológicas de infectividad o indexaje biológico y, en ocasiones, la microscopía electrónica.

La microscopía electrónica sirve para la observación de la morfología de las partículas virales o viriones. Las aplicaciones más comunes de este método en el diagnóstico se centran en la observación de viriones a partir de extractos crudos o purificados y a partir de secciones ultrafinas de tejidos vegetales infectados. Actualmente esta metodología no se emplea de forma rutinaria en el diagnóstico debido a su baja sensibilidad y especificidad diagnóstica, ya que requiere de títulos virales altos y no es capaz de discriminar infecciones mixtas de virus con morfologías similares, pero sí que se emplea para identificar la morfología de los viriones.

Las pruebas biológicas de infectividad permiten la detección inespecífica de virus que pueden ser transmitidos mecánicamente y se basan en la inoculación de material vegetal infectado en plantas susceptibles o indicadoras a virosis, que actúan como indicadores biológicos cuando manifiestan síntomas. En concreto, las plantas indicadoras comúnmente empleadas son Rupestris de Lot y Rupestris St. George para identificar el entrenudo corto infeccioso, el jaspeado y la madera rizada, Cabernet Sauvignon para identificar el enrollado y L.N. 33 para la madera acorchada. Respecto a la metodología empleada en este tipo de ensayo, se requiere de personal técnico cualificado capaz de llevar a cabo los experimentos de indexaje y de pruebas de campo, por un periodo de tres años para proporcionar resultados fehacientes (BOE-A-1997-5402). Otra limitación que tienen este tipo de pruebas es que requieren de la asistencia de métodos moleculares o serológicos posteriores, para poder dilucidar el agente vírico causal de la sintomatología que se manifiesta. A pesar de sus limitaciones, las pruebas de infectividad siguen siendo utilizadas hoy en día para el control y certificación de plantas sanas.

Respecto a las pruebas serológicas, el método inmunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) es la principal herramienta serológica empleada para la detección de virus fitopatógenos. Dicha técnica o inmunoensayo se basa en el uso de uno o varios anticuerpos (Ab) marcados que, al reconocer un antígeno (Ag) (partícula viral), generan un producto detectable que sirve como indicador de dicha unión. Este tipo de ensayo es muy útil, ya que se trata de un método económico que permite procesar un elevado número de muestras. Sin embargo, posee una serie de inconvenientes relacionados con su diseño, especificidad y sensibilidad. La obtención y producción de Ab policlonales no es reproducible ya que cada lote tiene su afinidad y especificidad y la obtención de Ab monoclonales es muy laboriosa y conlleva mucho tiempo, por lo que la ausencia de Ab contra importantes patógenos es elevada. Además, los inmunoensayos suelen generar reacciones cruzadas con frecuencia, reduciendo la especificidad del diagnóstico. Por último, su límite de detección o sensibilidad es inferior al de las técnicas moleculares.

Las técnicas moleculares se basan principalmente en la detección de los ácidos nucleicos que conforman el genoma viral, siendo actualmente la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa, *Polymerase Chain Reaction*) y todas sus variantes la herramienta de diagnóstico y detección más fiable, precisa y barata de la que se dispone. Dicha técnica, se basa en la amplificación específica de una región del genoma viral, mediante el uso de cebadores (secuencias de oligonucleótidos específicas), y enzimas termoestables (Taq polimerasas) y transcriptasas inversas o retrotranscriptasas, que mediante un procedimiento de ciclos repetidos de temperatura (desnaturalización de molde, hibridación de cebadores y extensión por la polimerasa) permiten amplificar exponencialmente secuencias específicas del virus, lo cual permite su detección incluso cuando el virus se encuentra en bajas concentraciones en la planta.

Actualmente, además de la gran sensibilidad y especificidad de la técnica, la disminución de los costes de los cebadores, así como la mejora de los procedimientos en la preparación de muestras, en la fidelidad de las polimerasas y en el análisis de los resultados ha hecho que las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR sea en la actualidad el método de detección estrella en el diagnóstico de enfermedades de plantas asociadas a virus (Rowhani *et al.*, 2017a).

El diagnóstico temprano de las virosis de vid no solo requiere de herramientas de detección fiables y precisas, sino que también es necesaria la estandarización y validación de los métodos y procedimientos empleados para su detección. En el caso de los países europeos y de la cuenca mediterránea existe una organización internacional responsable de la cooperación y armonización en la protección vegetal denominada *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) la cual tiene como uno de sus principales objetivos el promover el uso de métodos de control modernos, seguros y efectivos para el control de plagas y enfermedades de plantas.

En este sentido la EPPO ha estandarizado una serie de protocolos (PM7) que sirven como guía para el correcto diagnóstico de enfermedades (EPPO, 2021). En estas guías de diagnóstico, diseñadas por expertos de cada campo de la fitopatología, se pueden encontrar una serie de parámetros diagnósticos (EPPO, 2018b) útiles para la estandarización y validación de los métodos de detección empleados, como son: (i) la sensibilidad analítica (la cantidad mínima que la técnica puede detectar de manera fiable; (ii) la especificidad analítica, que abarca la inclusividad del método (detección de variantes/aislados que abarcan la diversidad genética y geográfica del virus diana) y la exclusividad del método (la no detección de otros virus que podrían estar presentes en la matriz); (iii) la selectividad (evaluación del rendimiento de la prueba utilizando diferentes matrices); y (iv) la repetitividad y reproducibilidad (evaluación de la consistencia del rendimiento de la prueba en diferentes réplicas por diferentes operadores y

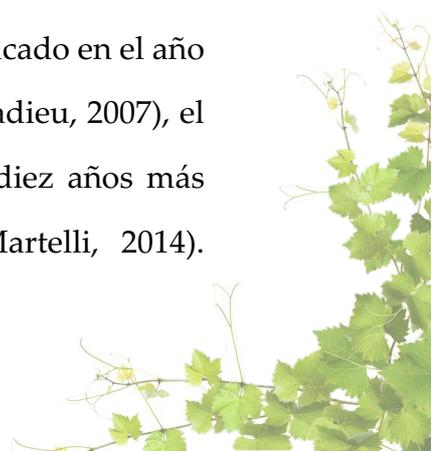
con diferentes equipos). Estos son los principales parámetros empleados para la validación de los métodos de detección de virus de plantas (EPPO, 2019).

### 1.5. Virosis emergentes de la vid

Se define como virus emergente a todo aquel virus que ha sido descrito o identificado recientemente y se asocia a una nueva enfermedad o a una enfermedad cuya etiología era desconocida hasta ese momento (Ertunc, 2019). Estos virus emergentes normalmente se encuentran poco caracterizados y se dispone de muy poca información sobre su biología y epidemiología. Normalmente los virus emergentes suelen estar asociados a enfermedades nuevas o emergentes que causan problemas directos o indirectos a la producción de uva. Se define como enfermedad emergente a aquella cuya incidencia aumenta en una nueva población después de su introducción inicial o en una población de hospedadores ya existente a causa de cambios radicales en su epidemiología (Woolhouse, 2002).

En los últimos años se han descrito diversos virus y enfermedades emergentes en la vid asociados algunos de ellos a importantes pérdidas socioeconómicas en el sector viticultor. Como principales virus emergentes encontramos a las especies: *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV); *Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus* (GRLDaV), *Grapevine asteroid mosaic associated virus* (GAMaV), *Grapevine virus E, F y T* (GVE, GVF y GVT), *Grapevine red blotch virus* (GRBV) y *Grapevine vein clearing virus* (GVCV). Estos virus emergentes han sido descritos en los últimos años, y algunos de ellos se han asociado a antiguas enfermedades cuya etiología se desconocía hasta ahora. En los últimos años, el número de virus descritos que infectan la vid ha sufrido un incremento considerable.

De acuerdo con el directorio de virus, viroides y fitoplasmas publicado en el año 2007 por G.P Martelli y E. Boudon-Padieu (Martelli & Boudon-Padieu, 2007), el número virus descritos en aquel momento era de 58 especies; diez años más tarde, este número se incrementó hasta las 65 especies (Martelli, 2014).



Actualmente el número de virus que infectan a la vid es de 89 especies (Fuchs, 2020; Rwahnih *et al.*, 2021; Fan *et al.*, 2021a,b). En menos de quince años el número de especies víricas se ha incrementado en más de un 35%. Este rápido incremento se debe a una combinación múltiple de varios factores: (i) el incremento del número de investigaciones en el área de los virus de la vid que utilizan la tecnología de secuenciación masiva (*high throughput sequencing* – HTS o next generation sequencing - NGS); (ii) el aumento del comercio internacional de plantas; (iii) el uso de nuevos ecosistemas o áreas para el cultivo de la vid; y (vi) el cambio climático (Hily *et al.*, 2018).

El reciente desarrollo de las nuevas tecnologías de HTS y su aplicación en el estudio de virosis en vid, ha provocado un incremento en el conocimiento de nuevas especies virales desconocidas hasta ahora. Esto se debe a la principal ventaja de la técnica, la cual radica en que no es necesario conocer previamente la información genética del microorganismo y/o virus en cuestión para poder detectarlo, esto permite que puedan ensamblarse, mediante herramientas bioinformáticas, multitud de secuencias nucleotídicas y recuperar genomas de organismos que se desconocían hasta ahora. Este procedimiento ha facilitado estudios poblacionales y epidemiológicos de nuevas enfermedades víricas cuya etiología era desconocida hasta ese momento (Saldarelli *et al.*, 2017a).

El aumento del comercio internacional de plantas y la expansión de la producción y los mercados de la vid a nuevas regiones o áreas geográficas ha provocado y provoca un incremento del riesgo de introducción y aparición de nuevas plagas y enfermedades.

Estas expansiones a nuevas áreas geográficas inducen cambios en la ecología de todo el pato-sistema implicado en el desarrollo de una enfermedad (hospedador, patógeno y vector), promoviendo cambios claves en la composición genética de las poblaciones que posibilitan la aparición y emergencia de nuevas enfermedades virales.

La introducción o aparición de estas nuevas enfermedades genera una relevante preocupación, ya que en el caso de los virus se debe considerar que estos son patógenos sistémicos para los que no existen remedios efectivos una vez la planta está infectada (Gergerich *et al.*, 2015).

Por otro lado, en el caso de la influencia del cambio climático sobre la aparición de nuevas virosis, se debe de considerar que afecta a los procesos fisiológicos de las plantas y por tanto afecta de igual forma a las poblaciones de microorganismos que habitan en ellas, incluyendo los virus (Trebicki, 2020). En términos generales estos cambios en el microbioma de las plantas promueven por un lado la alteración en la epidemiología de ciertas especies víricas que ya son conocidas y a su vez puede provocar la aparición de nuevos aislados o especies virales debido a las nuevas presiones evolutivas ocasionadas por el nuevo entorno (Cantó *et al.*, 2009). Así, las respuestas fisiológicas de la planta al cambio climático pueden producir cambios en la sensibilidad de la planta al patógeno, variaciones de la agresividad de los virus y la adaptación del virus a nuevos vectores.

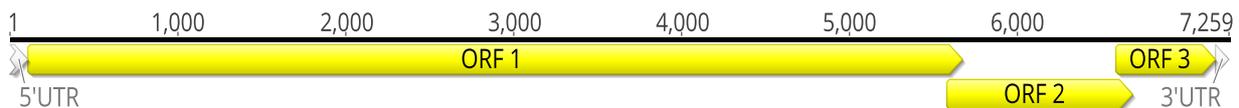
### 1.5.1. Grapevine Pinot gris virus

Grapevine Pinot gris virus, es un virus perteneciente al género *Trichovirus*, familia *Betaflexiviridae*, descrito por primera vez en el año 2012 en la región de Trentino (Italia) en vid de la variedad Pinot gris. El genoma de GPGV consta de una molécula de simple cadena de RNA de sentido positivo, (+)ssRNA, con un tamaño que ronda entre los 7223 a los 7275 nucleótidos (nt), excluyendo el extremo o cola poli-A. El genoma de GPGV consta de tres pautas de lectura abiertas (*Open reading frames*, ORFs) superpuestas y dos regiones no codificantes (*Untranslated region*, UTR) localizadas en ambos extremos (5' y 3').



## Introducción

La ORF 1 es una poliproteína de unos 1856 aminoácidos (aa) que codifica una metiltransferasa, una helicasa y una RNA polimerasa dependiente de RNA (*RNA dependent RNA polymerase*, RdRp), la ORF 2 codifica una proteína de movimiento (*movement protein*, MP) y la ORF 3 codifica la proteína de la cápsida (*coat protein*, CP) (Figura 8).



**Figura 8.** Representación gráfica de la organización del genoma de grapevine Pinot gris virus (GPGV) obtenida a partir del genoma de referencia de la especie (NC015782). En amarillo se representan las ORF 1, 2 y 3 que codifican la poliproteína, la proteína de movimiento y la proteína de la cápsida respectivamente. En gris se representan los extremos UTRs.

Este nuevo tricovirus se asoció a la enfermedad del moteado y deformación de la hoja de la vid, con síntomas como el moteado clorótico, arrugamientos y deformaciones de las hojas y la disminución del rendimiento y calidad de las bayas (Figura 9) (Giampetruzzi *et al.*, 2012). Dado que las plantas infectadas en campo con GPGV a menudo suelen estar infectadas simultáneamente por otros virus (lo cual dificulta el atribuir una etiología específica) se realizó un estudio basado en clones infecciosos del virus, que confirmó que los síntomas causados por este virus son idénticos a los observados en vides infectadas cultivadas en campo (Tarquini *et al.*, 2019).

Por otro lado, se ha descrito que otros factores, como el título viral y el tipo de aislado que infecta a la planta, también podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Bertazzon *et al.*, 2017).

La aplicación de técnicas moleculares (RT-PCRs y HTS) ha confirmado que este virus se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo, habiéndose detectado infectando vides en Italia, Grecia, República Checa, Eslovaquia, Eslovenia, Francia, Alemania, Portugal, Corea del Sur, China, Canadá, USA, España, Turquía, Brasil, Croacia, Rumania, Ucrania, Australia, Líbano, Algeria,

Argentina, Japón, Irán, Bulgaria y Armenia (Bertazzon *et al.*, 2016, 2021; Ruiz-García & Olmos, 2017; Saldarelli *et al.*, 2017b; Fajardo *et al.*, 2017; Wu & Habili, 2017; Debat *et al.*, 2020; Tokhmechi & Koolivand, 2020; Eichmeier *et al.*, 2020; Abe & Nabeshima, 2021).

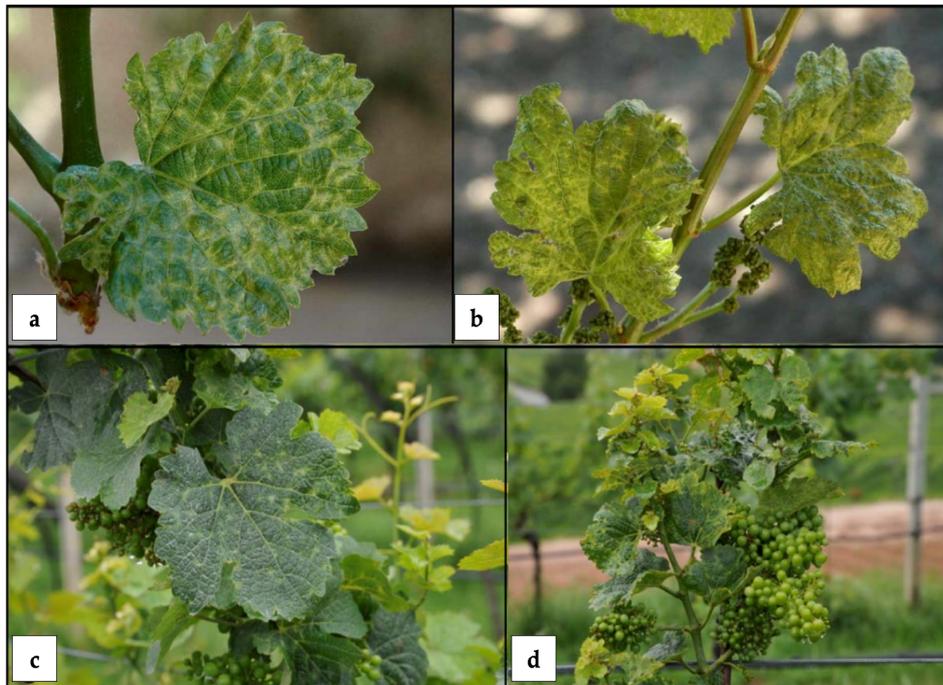
Recientemente, un estudio basado en el análisis de genomas completos del virus ha planteado la posibilidad de que GPGV tenga su origen en Asia central, desde donde se ha dispersado hasta Europa y a las Américas (Hily *et al.*, 2020).

Esta amplia dispersión de GPGV a nivel mundial ha impulsado la realización de estudios epidemiológicos para esclarecer las relaciones filogenéticas entre los aislados de diferentes países y profundizar en el esclarecimiento de las diferencias entre aislados agresivos que producen enfermedad y aislados no agresivos que no producen sintomatología. Recientes investigaciones sostienen que GPGV es capaz de transmitirse rápidamente dentro de los monocultivos de vid (Bertazzon *et al.*, 2020), y que además es capaz de infectar e inducir síntomas en hospedadores herbáceos pertenecientes a las especies *Silene latifolia* subsp. *alba* y *Chenopodium album* L., que podrían actuar como reservorios naturales del virus (Gualandri *et al.*, 2017).

Desde la primera descripción de GPGV en el año 2012 hasta 2018, se desarrollaron varios métodos de detección para su diagnóstico, unos basados en métodos de indexaje biológico (Saldarelli *et al.*, 2015) y otros métodos moleculares basados en RT-PCR convencionales (Glasa *et al.*, 2014; Beuve *et al.*, 2015) y RT-PCR en tiempo real basado en la química SYBR Green (Bertazzon *et al.* 2017). Estos métodos han sido muy útiles para los estudios epidemiológicos del virus. Sin embargo, considerando la amplia variabilidad genética de este tricovirus (Hily *et al.*, 2020), es posible que no sean suficientes para el correcto diagnóstico del mismo.

Por otro lado se ha descrito un vector potencial de transmisión del virus, el ácaro *Colomerus vitis*, capaz de transmitir el virus a vides sanas en condiciones experimentales (Malagnini *et al.*, 2016).

Sin embargo, hasta el momento, GPGV no ha sido detectado en *C. vitis* en condiciones naturales, por lo que, a falta de más ensayos experimentales de transmisión, este eriófido sigue siendo de momento solo un posible vector de GPGV.



**Figura 9.** Síntomas asociados a grapevine pinot gris virus (GPGV) que incluyen: **a-b**, moteado clorótico y deformaciones foliares en los cultivares Pinot gris y Traminer; **c-d**, síntomas de retraso del crecimiento en hojas y bayas en la variedad Traminer. Fotos extraídas de la publicación de Giampetruzzi *et al.*, 2012.

Algunos estudios referentes a la variabilidad de los genomas de GPGV han descrito la existencia de una gran diversidad genética dentro de las poblaciones de este virus (Glasa *et al.*, 2014; Saldarelli *et al.*, 2015; Bertazzon *et al.*, 2017).

Dentro de esta diversidad genómica, se ha descrito la presencia de un polimorfismo que introduce un codón de parada localizado en la ORF 2, que produce un acortamiento de seis aminoácidos en la proteína de movimiento (Saldarelli *et al.*, 2015). Aunque este polimorfismo inicialmente se relacionó con los síntomas observados en las vides infectadas con GPGV, estudios filogenéticos posteriores basados en las secuencias genómicas de la MP y la CP agruparon aislados sintomáticos y asintomáticos próximos y además distribuidos en diferentes posiciones de los árboles filogenéticos, demostrando que no había una

clara asociación entre la variante genética con la mutación en la MP y la manifestación de los síntomas (Saldarelli *et al.*, 2015; Bertazzon *et al.*, 2017).

La amplia distribución y diversidad genética de GPGV, la existencia de potenciales vectores y reservorios de transmisión y el efecto de la enfermedad en la producción de uva resaltan la necesidad de realizar más estudios de cara al futuro que aporten conocimientos sobre la epidemiología de la enfermedad y proporcionen estrategias de control eficaces. En este escenario, el uso de métodos de detección específicos y fiables es en la actualidad un factor clave para el manejo y control de la enfermedad asociada a este virus.

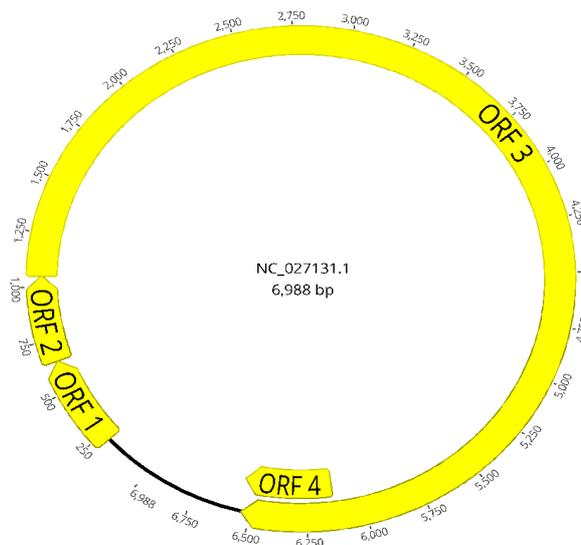
### 1.5.2. Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus

Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV) es un virus perteneciente al género *Badnavirus*, familia *Caulimoviridae*, descrito por primera vez en el año 2015 en Grecia (Maliogka *et al.*, 2015). El genoma de GRLDaV fue caracterizado por primera vez mediante técnicas de HTS empleando como material de partida pequeños RNAs interferentes (siRNA) a partir de una planta de vid sintomática de 20 años perteneciente al cv. Roditis y que mostraba la sintomatología de una antigua enfermedad de la vid de etiología desconocida denominada decoloración de la hoja de Roditis (*Roditis leaf discoloration disease*, RLD), descrita por primera vez en 1981 (Rumbos & Avgelis, 1989).



## Introducción

El genoma de GRLDaV consta de una sola molécula de DNA circular de doble cadena, de un tamaño que oscila entre 6988 y 7097 nt de longitud, que contiene cuatro ORFs y una región UTR. Las ORFs 1, 2 y 4 codifican proteínas hipotéticas de función desconocida. La ORF 3 codifica una poliproteína de 1831 aa que contiene la proteína de movimiento (MP), la proteína de la cubierta (CP), la proteasa, la transcriptasa inversa (RT) y la ribonucleasa H (RNasaH) (Maliogka *et al.*, 2015) (Figura 10).

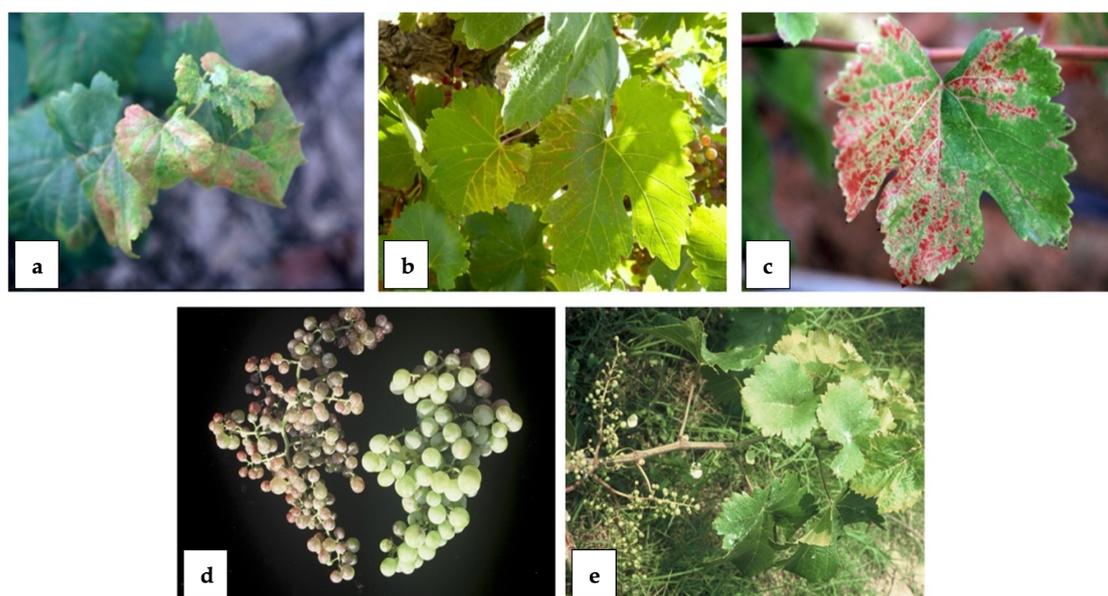


**Figura 10.** Representación gráfica de la organización del genoma de grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV) a partir del genoma de referencia de la especie (NC027131.1). En amarillo se representan las ORFs 1, 2 y 4, que codifican proteínas hipotéticas y la ORF 3 que codifica la poliproteína.

Aunque aún no se han podido completar los postulados de Koch con este virus emergente, en la actualidad GRLDaV ha sido detectado solo en vides que presentan síntomas típicos de RLD (Martelli *et al.*, 2017).

Los síntomas asociados a este nuevo *Badnavirus* suelen manifestarse a finales del verano e incluyen decoloraciones en las hojas de tonalidades verdosas claras a lo largo de los nervios, amarillentas o rojizas, clorosis internerviales, deformaciones del limbo acompañadas de enrojecimientos y enrollados de las hojas, reducción del número y tamaño de las bayas y un menor contenido de azúcar en las mismas (Figura 11) (Rumbos & Avgelis, 1989; Maliogka *et al.*, 2015).

En vistas de que existe una clara evidencia de que este virus puede causar daños a los cultivos de vid, en octubre de 2018 GRLDaV fue incluido en la lista de alertas de la EPPO como un riesgo fitosanitario potencial para la región europea y mediterránea (EPPO, 2018a). GRLDaV es un virus que en la actualidad tiene una distribución geográfica baja y desde su primera identificación en Grecia, de momento solo ha sido descrito en Italia, Turquía, Croacia y Sudáfrica (Chiumenti *et al.*, 2015; Vončina & Almeida, 2018; Ulubaş Serçe *et al.*, 2018; Bester *et al.*, 2021). A pesar de tratarse de un virus incluido en la lista de alertas de la EPPO, hasta el momento se han descrito pocos métodos de diagnóstico para su detección y tan solo un método de PCR en tiempo real basado en la química SYBR Green (Maliogka *et al.*, 2015). Respecto a la transmisión GRLDaV, de momento solo se ha demostrado que es transmisible mecánicamente a plantas herbáceas (Maliogka *et al.*, 2015) y, aunque hasta la fecha no se han identificado vectores biológicos que lo transmitan, es probable que se transmita mediante cochinillas, dado que la mayoría de los badnavirus se propagan por medio de estos insectos (Bhat *et al.*, 2016).

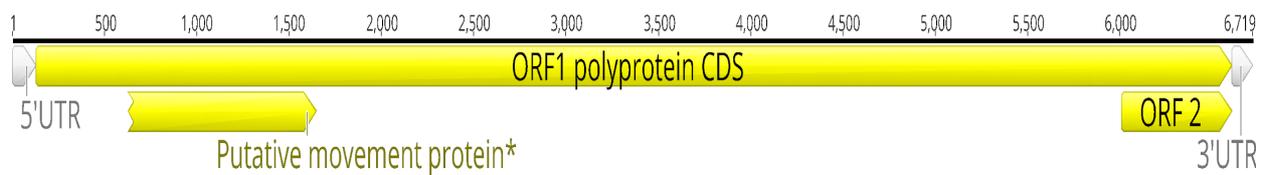


**Figura 11.** Síntomas de la enfermedad *Roditis leaf discoloration disease* asociados a grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV); **a.** deformaciones del limbo acompañadas de enrojecimientos y enrollados de las hojas; **b.** clorosis internerviales; **c.** decoloraciones en las hojas de tonalidad rojiza; **d.** Racimos de vid de la variedad Roditis infectados y sanos; **e.** Racimos de vid de la variedad Roditis infectados en campo. Fotos extraídas de la publicación de Maliogka *et al.*, (2015).

### 1.5.3. Grapevine asteroid mosaic associated virus

Grapevine asteroid mosaic associated virus (GAMaV) es un virus miembro del género *Marafivirus*, familia *Tymoviridae*. Descrito por primera vez en California (USA) (Martelli, 2014) fue asociado a una enfermedad descrita en 1965, llamada mosaico asteroide de la vid (*grapevine asteroid mosaic disease*, GAMD) (Refatti & Hewitt, 1965). Publicaciones recientes asocian la presencia de este timovirus al complejo del jaspeado o *fleck*, (Martelli, 2014, 2017; Vargas-Asencio *et al.*, 2017), que engloba diferentes enfermedades en las que se incluyen el jaspeado de la vid y el mosaico asteroide de la vid. Hasta el momento GAMaV es el único virus asociado con la enfermedad del mosaico de asteroide de la vid dentro de este complejo (Sabanadzovic *et al.*, 2017).

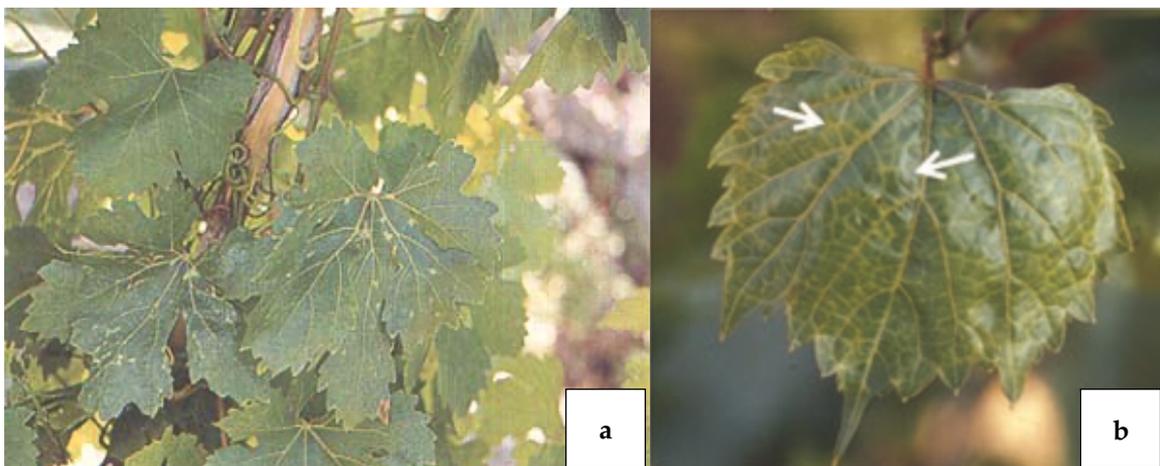
Sin embargo, aún no está clara la asociación entre la sintomatología de GAMD y GAMaV, ya que de momento no se han completado los postulados de Koch y existen pocas investigaciones referentes a la relación entre los síntomas y la presencia del virus. A pesar de ser un virus asociado a un complejo de enfermedades muy conocido, el genoma completo de GAMaV solo ha sido caracterizado recientemente, concretamente en el año 2017 (Vargas-Asencio *et al.*, 2017). Dicho genoma consiste en una molécula de simple cadena de RNA de sentido positivo, (+)ssRNA, con un tamaño que oscila entre los 6692 y los 6719 nucleótidos, excluyendo el extremo poli-A. El genoma de GAMaV consta de dos ORFs (ORF 1 y ORF 2), y dos regiones UTR localizadas en ambos extremos (5' y 3'). La ORF 1 codifica una poliproteína de 2158 aa que contiene los dominios conservados reconocidos de una metiltransferasa (MT), una proteasa (Pro) una helicasa (Hel), una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y una secuencia de una posible proteína superpuesta (*Overlapping protein*, OP), de unos 339 aa, cuya función podría estar relacionada con el movimiento del virus y ser una proteína de movimiento (*putative movement protein*) (Vargas-Asencio *et al.*, 2017). Por otro lado, la ORF 2 codifica la proteína de la cápsida (*coat protein*, CP) (Figura 12).



**Figura 12.** Representación gráfica de la organización del genoma de grapevine asteroid mosaic associated virus (GAMaV) obtenida a partir del genoma de referencia de la especie (NC\_031692). En amarillo se representan las ORF 1 y 2 los cuales codifican una poliproteína y la proteína de la cápsida respectivamente. En gris se representan los extremos UTRs. \*Se representa también la posible proteína de movimiento descrita por Vargas-Asencio *et al.*, (2017).

Los síntomas asociados al GAMaV incluyen moteado clorótico distribuido irregularmente sobre el limbo foliar (*chlorotic mottling*). Cuando los síntomas se intensifican, dichas manchas se fusionan y aparecen puntos necróticos en el centro de las mismas. También aparecen aclaramientos de las nervaduras primarias y secundarias. A menudo las plantas infectadas se atrofan y no producen frutos (Refatti & Hewitt, 1965).

El análisis por indexaje biológico en *V. rupestris*, muestra la aparición síntomas foliares diferentes a los inducidos por la enfermedad del jaspeado (Figura 13).



**Figura 13.** Síntomas de la enfermedad mosaico asteroide de la vid: **a**, manchas en forma de estrellas distribuidas irregularmente sobre el limbo foliar; **b**, aclaramiento de venas primarias y secundarias señalado con flechas en *V. rupestris*. Fotos cortesía de U. Prota, disponible en [FAO.org](http://FAO.org), y extraídas de la publicación de Sabanadzovic *et al.*, (2017).

Muchos de los virus asociados al complejo de enfermedades del jaspeado se encuentran de manera latente en casi todas las vides cultivadas en Europa (Sabanadzovic *et al.*, 2000). Sin embargo, en el caso particular del GAMaV la distribución es relativamente baja, habiendo sido solo detectado en USA, Japón, Canadá, Uruguay, Francia, Hungría e Italia (Nakaune *et al.*, 2008a; Vargas-Asencio *et al.*, 2017; Candresse *et al.*, 2017; Porceddu *et al.*, 2018).

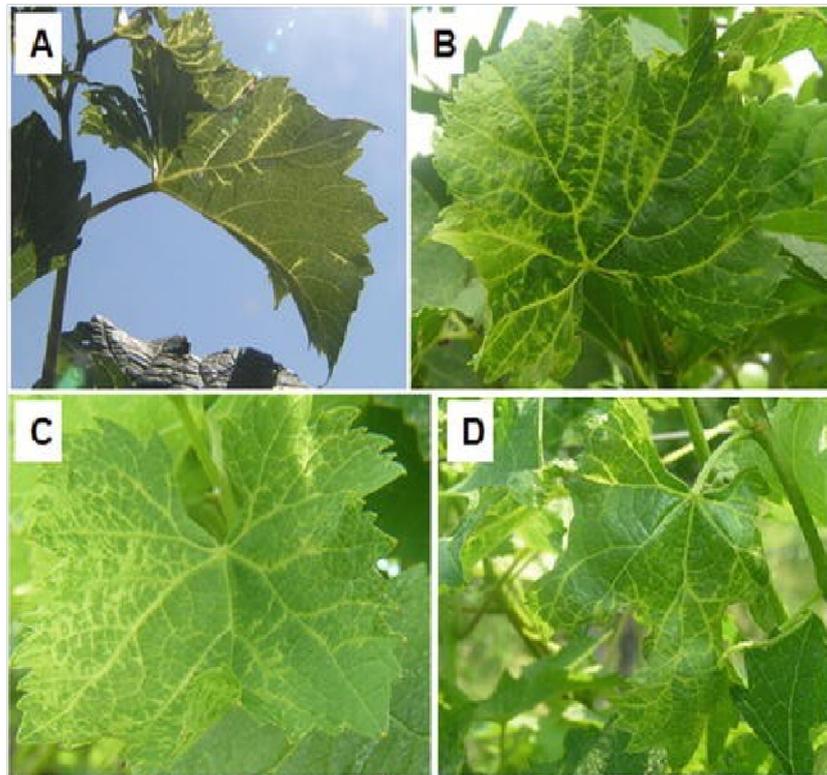
Un estudio reciente sobre la prevalencia de este virus en variedades de vid silvestres y comerciales localizadas en el estado de Nueva York (USA), muestra que probablemente GAMaV sea un virus autóctono de Norte América (Thompson *et al.*, 2021). De momento no se disponen de herramientas validadas de diagnóstico para este virus, más allá de las RT-PCR descritas en las primeras detecciones del virus en las diferentes regiones geográficas (Nakaune *et al.*, 2008; Vargas-Asencio *et al.*, 2017; Candresse *et al.*, 2017; Porceddu *et al.*, 2018).

Por último, referente a la epidemiología de GAMaV, existe escasa información al respecto. Hasta el momento no se ha identificado ningún vector del virus, al igual que para el resto de virus asociados al complejo de enfermedades del jaspeado (Fuchs, 2020), por lo que se supone que la transmisión de GAMaV solo ocurre a través de propagación vegetativa (Sabanadzovic *et al.*, 2017).

### 1.5.4. Grapevine vein clearing virus

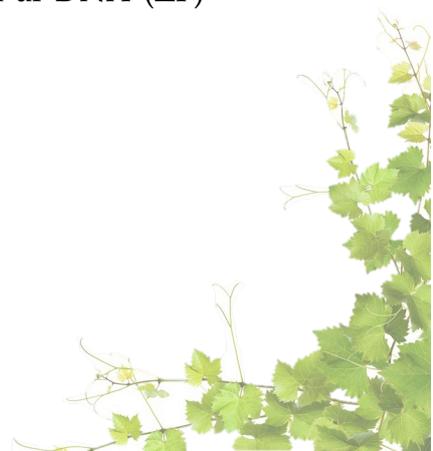
Grapevine vein clearing virus (GVCV) es un virus emergente miembro de la familia *Caulimoviridae*, género *Badnavirus* descrito en el año 2011, a partir de cuatro plantas de vid (cv. Vidal Blanc, Chardonnay, Cabernet Franc y Corot noir) en la región oeste de los USA. GVCV se ha asociado a la enfermedad del aclaramiento de nervaduras o *vein clearing* que en algunos casos se acompaña de deformaciones en las hojas (Figura 14) (Zhang *et al.*, 2011).

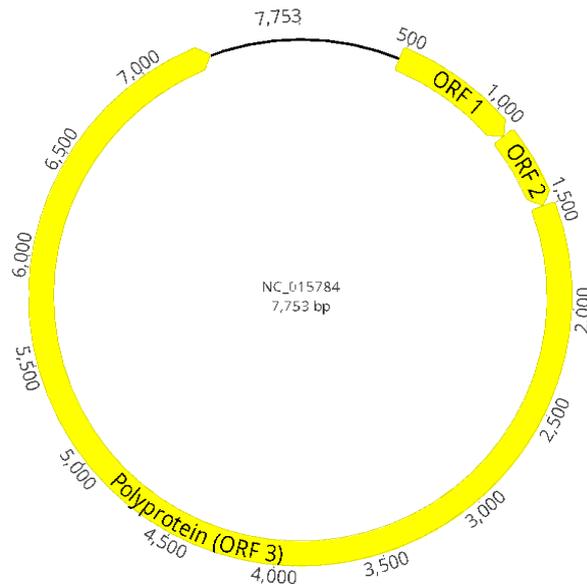
Estudios posteriores han demostrado que GVCV es capaz de infectar también plantas silvestres en la familia *Vitaceae* como son *V. Rupestris* y *Ampelopsis cordata* (Beach *et al.*, 2017; Petersen *et al.*, 2019). De momento GVCV solo ha sido reportado en USA, por lo que se dispone de muy poca información de este virus.



**Figura 14.** Síntomas asociados al virus grapevine vein clearing virus (GVCV) en hoja de vid (*Vitis vinifera* L.): **a-b**, visualización del aclarado en nervaduras en hojas del cultivar Chardonnay; **c**, aclarado de venas en el cultivar Vidal Blanc; **d**, aclaramiento de venas acompañada de deformaciones en las hojas en el cultivar Cabernet Sauvignon. Fotos extraídas de la publicación de Qiu & Schoelz, (2017).

El genoma de GVCV consiste en una hebra de dsDNA de un tamaño de 7753 nt que codifica tres ORFs. Las ORF 1 y 2 codifican dos proteínas hipotéticas de las cuales se desconoce su función, y la ORF más grande (ORF 3) codifica una poliproteína que contiene los dominios conservados de una transcriptasa inversa (RT), una RNasa H y una proteína con dedos de zinc de unión al DNA (ZF) (Figura 16).





**Figura 15.** Representación gráfica de la organización del genoma del grapevine vein clearing virus (GVCV) a partir del genoma de referencia de la especie (NC\_015784). En amarillo se representan las ORFs 1, 2 y 3 que codifican dos proteínas hipotéticas y la poliproteína respectivamente.

En lo referente a la epidemiología de este virus, se ha confirmado que GVCV es se transmite por injerto (Zhang *et al.*, 2011) por lo que la propagación del material infectado es la principal vía de propagación de este virus. Pero el hecho de que la enfermedad se haya observado cada vez con mayor frecuencia en los viñedos americanos, sugiere que GVCV pueda transmitirse mediante vectores (Qiu & Schoelz, 2017).

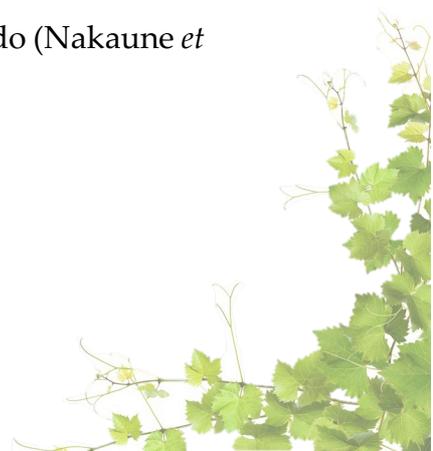
Dos estudios recientes, han confirmado que GVCV puede ser transmitido por la especie de pulgón nativo americano *Aphis illinoisensis* tal como se ha demostrado en condiciones de invernadero (Petersen *et al.*, 2019; Uhls *et al.*, 2021). Sin embargo, este virus, de momento, no ha sido detectado en pulgones de esa misma especie en condiciones naturales. Por tanto, se necesitan más estudios para comprender mejor la biología, la epidemiología, la distribución geográfica y el impacto económico de GVCV.

Respecto a los métodos de diagnóstico empleados para la detección de GVCV, de momento solo se emplean protocolos de PCR convencional, y hasta el momento hay descritos hasta seis (Zhang *et al.*, 2011; Qiu & Schoelz, 2017), siendo los más empleados para la detección de GVCV los descritos por Zhang *et al.*, 2011.

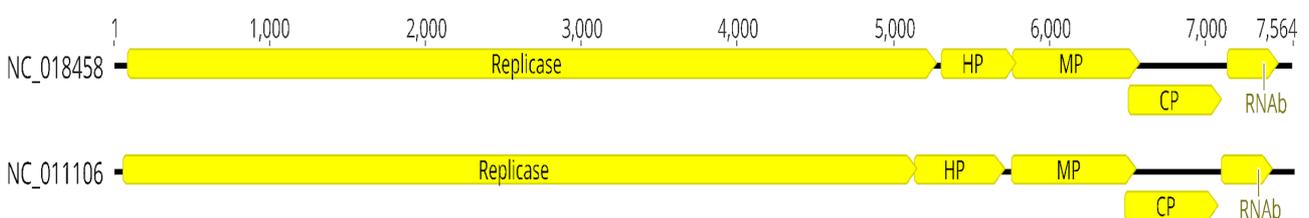
### 1.5.5. Grapevine virus E y Grapevine virus F

Grapevine virus E (GVE) y grapevine virus F (GVF) son virus emergentes miembros de la familia *Betaflexiviridae*, género *Vitivirus* (Nakaune *et al.*, 2008b; Al Rwahnih *et al.*, 2012). GVE fue descrito por primera vez en 2008 en una planta de vid de la especie *Vitis labrusca* (variedad Pione) en Japón (Nakaune *et al.*, 2008b) y desde su primera identificación hasta ahora ha sido descrito en Sudáfrica, China, Túnez, Estados Unidos, Argentina y Grecia (Coetzee *et al.*, 2010; Alabi *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2013; Rwahnih *et al.*, 2017; Panailidou *et al.*, 2019; Debat *et al.*, 2020). GVE ha sido detectado tanto en vides asintomáticas (Nakaune *et al.*, 2008b; Alabi *et al.*, 2013; Debat *et al.*, 2020) como sintomáticas, las cuales incluyen síntomas de punteadura de la madera (Nakaune *et al.*, 2008b), síntomas asociados a la enfermedad de Syrah (Coetzee *et al.*, 2010) y también síntomas asociados al complejo de la madera rugosa (Al Rwahnih *et al.*, 2012).

Aunque el papel de GVE como agente causal de una enfermedad no está claro, lo que sí se ha estudiado es la relación de este virus con una mayor incidencia y título de otros vitivirus (Grapevine virus A y Grapevine virus B) y un sinergismo que potencia la gravedad de la enfermedad del enrollado causada por GLRaV-2 y/o GLRaV-3 cuando se encuentran coinfectando la misma planta (Rowhani *et al.*, 2017b, 2018). Respecto a la transmisión de GVE, se ha observado que puede ser transmitido por la cochinilla *Pseudococcus comstocki* (en condiciones de experimentales) y mediante injerto de material vegetal contaminado (Nakaune *et al.*, 2008b).



Por otro lado, GVF fue identificado por primera vez mediante técnicas de HTS en el año 2012 en USA a partir de una planta de vid de uva tinta (Al Rwahnih *et al.*, 2012). Desde su descripción hasta ahora ha sido descrito en numerosos países de todo el mundo: Reino Unido, Alemania, Argentina, Turquía, Túnez, Sudáfrica, Rusia, Malta, Líbano, Kosovo, Jordania, Japón, Israel, Irán, India, Hungría y Grecia (Al Rwahnih *et al.*, 2014; Molenaar *et al.*, 2015; Selmi *et al.*, 2017; Elbeaino, 2019; Panailidou *et al.*, 2019; Sabaghian *et al.*, 2019; Chiaki & Ito, 2021). GVF, al igual que GVE, de momento no se ha asociado claramente a una enfermedad específica, pero al parecer sí que podría actuar de forma sinérgica con virus del complejo de la madera rugosa y agravar la incompatibilidad en ciertos portainjertos (Freedom, 420A, 3309C y 101-14) (Al Rwahnih *et al.*, 2012, 2014). Sin embargo, se requieren más investigaciones para confirmar todo ello. Hasta el momento no se conocen vectores de GVF (Basso *et al.*, 2017), aunque al tratarse de un virus de la familia *Betaflexiviridae* es posible que pueda ser transmitido por alguna especie de pseudocóccido (Andrew *et al.*, 2012). Los genomas de GVE y GVF son muy similares, ambos están conformados por una cadena simple de RNA en sentido positivo, (+)ssRNA, de 7.564 y 7551 nt respectivamente, que contienen cinco ORF que codifican una replicasa (Rep), una proteína hipotética de función desconocida (HP), una proteína de movimiento (MP), una proteína de cubierta (CP) y una proteína de unión al RNA (RNAb) (Figura 16).



**Figura 16.** Representación gráfica de la organización del genoma de Grapevine virus F (GVF) y Grapevine virus E (GVE) obtenida a partir del genoma de referencia de ambas especies (NC\_018458 y NC\_011106, respectivamente). En amarillo se representan las ORFs que codifican una replicasa (Replicase), una proteína hipotética de función desconocida (HP), una proteína de movimiento (MP), una proteína de cubierta (CP) y una proteína de unión al RNA (RNAb).

Respecto a los métodos de diagnóstico empleados para la detección de estos vitivirus, al tratarse de virus que posiblemente juegan un papel en la etiología de la enfermedad de la madera rizada y en posibles incompatibilidades en diferentes portainjertos, existen numerosas herramientas para detectarlos.

Las principales herramientas se basan en su detección por RT-PCR convencional y en tiempo real, incluso empleando metodologías multiplex para la detección simultánea de GVE, GVF y otros vitivirus como GVA y GVE (Nakaune *et al.*, 2008b; Al Rwahnih *et al.*, 2014; Elbeaino *et al.*, 2019; Diaz-Lara *et al.*, 2020; Tokhmechi & Koolivand, 2020).

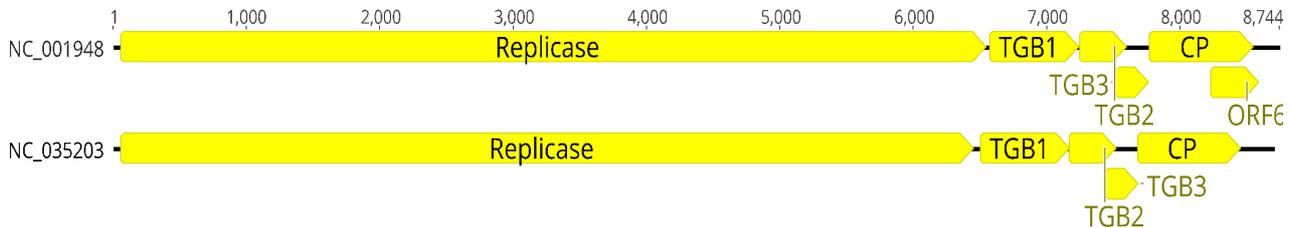
### 1.5.6. Grapevine virus T

Grapevine virus T (GVT) es un nuevo virus perteneciente a la familia *Betaflexiviridae*, género *Foveavirus*, identificado por primera vez en 2017 a partir del análisis del transcriptoma de una vid de la variedad Teroldego (Jo *et al.*, 2017). GVT es un virus que está filogenéticamente relacionado con GRSPaV, virus asociado al complejo de la enfermedad de la madera rugosa (Meng & Rowhani, 2017). Un reciente estudio sobre la diversidad de GVT, donde se compararon los genomas de GVT y GRSPaV, demostró que las características genómicas de ambos virus son muy similares (Zarghani *et al.*, 2018).

Desde la primera descripción de GVT, se ha detectado en Alemania, Croacia, Eslovaquia y República Checa (Vončina & Almeida, 2018; Ruiz-García *et al.*, 2018; Glasa *et al.*, 2018; Zarghani *et al.*, 2018).

La organización genómica de GVT es típica de los foveavirus y consiste en una hebra de RNA lineal de sentido positivo, (+)ssRNA, de un tamaño de 8.744 nt que codifica cinco ORFs: la ORF 1 corresponde a una proteína de replicación (Replicase), y las ORF 2, 3 y 4 codifican tres proteínas asociadas con el movimiento (TGB1-2-3) y por último la ORF 4 codifica la proteína de la cápsida (CP).

La organización genómica de GVT es similar a la de GRSPaV, con la excepción de la presencia de una posible ORF que presenta GRSPaV y que está ausente en GVT (ORF6) (Figura 17).



**Figura 17.** Representación gráfica de la organización del genoma de *Grapevine rupestris stem pitting* (GRSPaV-1) y *Grapevine virus T* (GVT) obtenida a partir de los genomas de referencia de ambas especies, NC\_001948 y NC\_035203 respectivamente. ORF 1 corresponden a una proteína de replicación (Replicase), y las ORF 2, 3 y 4 codifican tres proteínas asociadas con el movimiento (TGB1-2-3), la ORF 4 codifica a proteínas de la cápsida (CP) y en el caso de GRSPaV-1 se encuentra la ORF 6 de codifica una proteína hipotética.

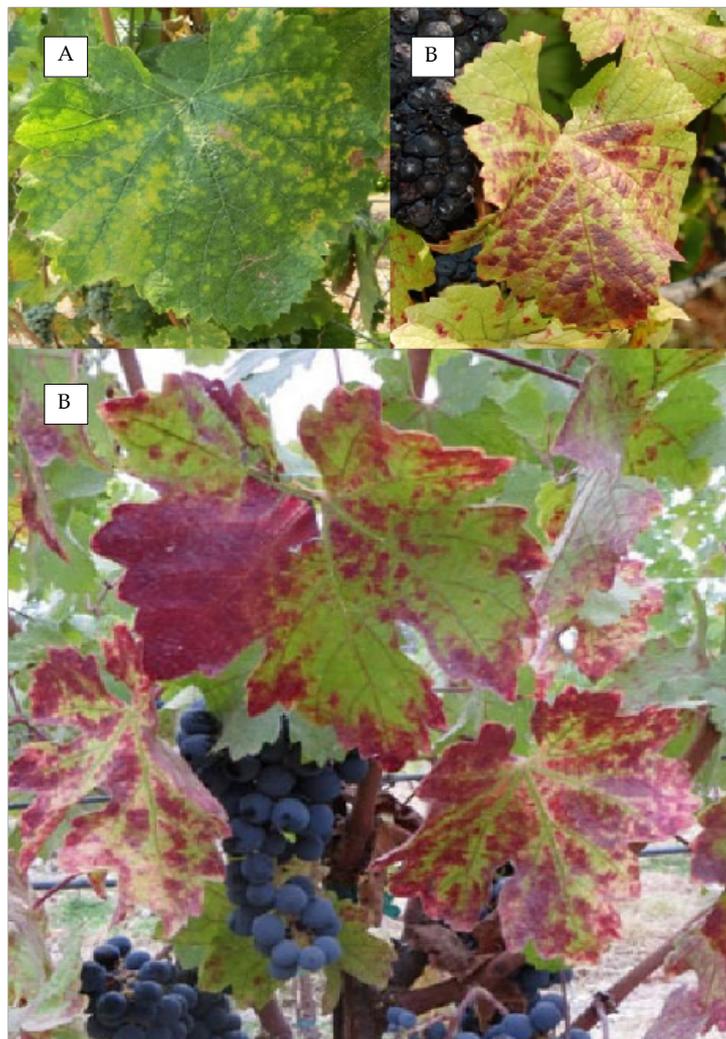
La dispersión de GVT es muy similar a la de GRSPaV y parece estar restringida a la transmisión por injerto de material vegetal infectado. Referente a los métodos de diagnóstico empleados para la detección de GVT, estos se han centrado principalmente en métodos RT-PCR convencional (Vončina & Almeida, 2018; Ruiz-García *et al.*, 2018; Glasa *et al.*, 2018; Zarghani *et al.*, 2018), aunque recientemente se ha desarrollado un método de RT-PCR en tiempo real (Diaz-Lara *et al.*, 2020).

### 1.5.7. Grapevine red blotch virus

Grapevine red blotch virus (GRBV) es un virus de la familia *Geminiviridae*, y del género *Glabrovirus*. Este virus se identificó por primera vez en el año 2008 en Oakville, California (USA), cuando se detectaron varias vides de la variedad Cabernet Sauvignon con síntomas asociados al complejo del enrollado de la vid, en las que, en base a los análisis de laboratorio, no se identificó ninguna especie de virus asociado a este complejo (Calvi, 2011). Simultáneamente, en los estados de Nueva York, Oregón y Washington (USA), otros investigadores detectaron esta misma patología y, mediante técnicas de amplificación por círculo rodante (RCA) y métodos de HTS, identificaron un nuevo virus de DNA de cadena

simple, ssDNA, circular al que denominaron GRBV (Krenz *et al.*, 2012; Al Rwahnih *et al.*, 2013; Seguin *et al.*, 2014). Es por ello que GRBV se le conoce también como grapevine cabernet franc-associated virus y grapevine redleaf-associated virus (GRLaV).

Estudios posteriores demostraron que GRBV ha estado presente en USA desde hace mucho tiempo, especialmente en los viñedos de California (Poojari *et al.*, 2013; Al Rwahnih *et al.*, 2015). Los síntomas causados por GRBV consisten en la aparición de manchas rojas en las hojas y nervaduras, y pueden ser confundidos muy fácilmente con los síntomas asociados a los virus del enrollado en lo referente a la coloración de las hojas (Yepes *et al.*, 2018) (Figura 18).



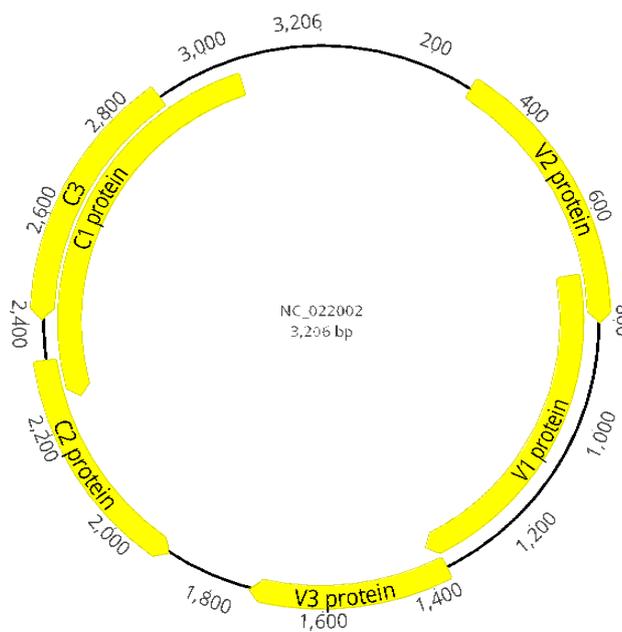
**Figura 18.** Síntomas asociados a grapevine red blotch virus (GRBV) en hoja vid (*Vitis vinífera* L.) de tres variedades diferentes: **a**, Chardonnay; **b**, Pinot noir; y **c**, cabernet franc. Fotos extraídas de la publicación de la EPPO *Global database*.

## Introducción

El genoma de GRBV consiste en una hebra de DNA monocatenario de un tamaño de 3.206 nt que contiene seis ORFs, las cuales codifican la proteína de cubierta V1 (CP), la proteína V2 y V3, ambas de función desconocida, la proteína C1, asociada a la replicación (RepA), y las proteínas C2 y C3, asociadas también a la replicación del virus (Sudarshana *et al.*, 2015) (Figura 19)

GRBV se encuentra muy extendido por regiones del norte de América, tanto en plantaciones de vid de USA (Al Rwahnih *et al.*, 2015), como también en las principales plantaciones de vid de Canadá y México (Poojari *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2018; Gasperin-Bulbarela *et al.*, 2018).

También ha sido detectado en Sudamérica (Argentina) y en Asia (India y Korea) (Lim *et al.*, 2016; Marwal *et al.*, 2019; Luna *et al.*, 2019).



**Figura 19** Representación gráfica de la organización del genoma de grapevine red blotch virus (GRBV) obtenida a partir del genoma de referencia NC\_022002. Se muestran los seis ORF los cuales codifican: la proteína de cubierta V1 (CP), la proteína V2 y V3 ambas de función desconocida, la proteína C1, asociada a la replicación (RepA), y las proteínas C2 y C3 asociadas también a la replicación del virus.

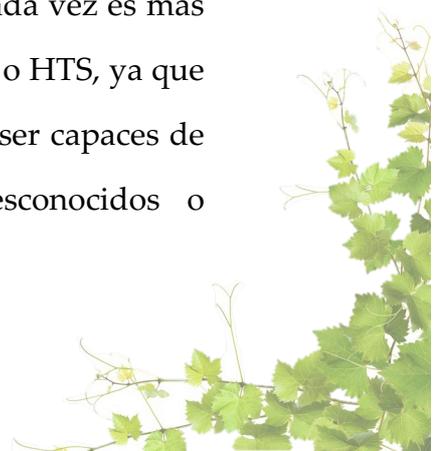
Respecto a los métodos de diagnóstico de GRBV, dado que la sintomatología asociada a este virus es muy parecida a la causada por virus asociados al complejo del enrollado, la inspección visual no es suficiente para su diagnóstico. Por ello, se han desarrollado herramientas de detección basadas en PCR

convencional como la desarrollada por Poojari *et al.*, (2013) y también PCR multiplex en tiempo real que cubren la diversidad genética de GRBV (Krenz *et al.*, 2014). Existen también otros estudios sobre la distribución del virus en la planta que indican que los pecíolos de las hojas viejas son los tejidos más adecuados para detectar a GRBV (Setiono *et al.*, 2018).

### **1.6. Implementación de nuevas técnicas moleculares en el diagnóstico de virus de la vid.**

En la actualidad, el diagnóstico e identificación de las virosis vegetales se centra en un amplio rango de técnicas de detección. Como ya se ha mencionado, las técnicas clásicas más utilizadas para el diagnóstico de virosis vegetales se fundamentan principalmente en ensayos biológicos, serológicos y moleculares. Concretamente, en el caso de las virosis de la vid, los ensayos biológicos se enfocan en el indexaje biológico, apoyado por otras herramientas de detección específica, principalmente las serológicas y moleculares, como las pruebas ELISA y de PCR. Todos estos métodos de detección son normalmente muy efectivos y proporcionan diagnósticos fiables cuando se trata de virus conocidos (Velasco & Padilla, 2021). Sin embargo, estas herramientas tienen una limitación principal, que radica en que se requiere una caracterización previa del virus que se desea detectar.

Cuando el agente causal de la enfermedad es desconocido o no se posee suficiente información biológica sobre el mismo, como es el caso de las virosis emergentes, estas herramientas pierden considerablemente su poder de resolución diagnóstica, ya que requieren de esta caracterización biológica y molecular previa del agente causal de la enfermedad. Por ello, cada vez es más frecuente la implementación de técnicas de secuenciación masiva o HTS, ya que solventan la problemática de las técnicas de detección clásica, al ser capaces de detectar e identificar tanto patógenos conocidos como desconocidos o



emergentes (Adams *et al.*, 2009; Velasco & Padilla, 2021). El desarrollo e implementación de las técnicas de HTS han supuesto un impacto en la virología de plantas, ya que se trata de una herramienta que permite explorar la diversidad viral, la ecología y las interacciones patógeno-hospedador que hasta ahora eran desconocidas (Saldarelli *et al.*, 2017a).

Las técnicas de HTS permiten la secuenciación masiva de una muestra a partir de una purificación de ácidos nucleicos, bien sea DNA o RNA. Estos ácidos nucleicos, pueden ser de diferente naturaleza (siRNA, RNA total, doble cadena de RNA- dsRNA, DNA lineal o DNA circular) y son procesados para la preparación de librerías y la secuenciación simultánea de millones de secuencias. El procedimiento empleado para la secuenciación masiva de estos ácidos nucleicos varía dependiendo del tipo de secuenciación y plataforma con la que se va a realizar la secuenciación (Illumina, Nanopore, etc.). Sin embargo, en términos generales los procedimientos empleados en esta técnica incluyen los siguientes pasos básicos: (i) preparación de la muestra, (ii) preparación de librerías, (iii) secuenciación y (iv) análisis bioinformático.

Durante el proceso de preparación de la muestra es muy importante obtener una muy buena calidad y cantidad de ácidos nucleicos necesaria para la preparación de librerías. Generalmente esta calidad y cantidad es cuantificada mediante análisis por espectrofotometría. Cuando la muestra se trata de RNA, esta debe de ser convertida en DNA complementario antes de la preparación de la librería.

El paso previo de la preparación de librerías es una fragmentación de los ácidos nucleicos y la en la preparación de las librerías se ligan adaptadores que tienen diferentes funciones. De hecho, la gran mayoría de tecnologías de HTS no pueden analizar fácilmente hebras de DNA muy largas, por lo que se necesita fragmentar los ácidos nucleicos para poder ser secuenciados. La fragmentación se realiza mediante métodos enzimáticos o mecánicos.

Después de la fragmentación, a los pequeños fragmentos de DNA se les adiciona una sola base de adenina (-A) en cada extremo para formar un saliente que permitirá la ligación de los adaptadores que contienen una sola base saliente de timina en sus extremos. Así, los adaptadores adicionados a estos fragmentos de DNA cumplen múltiples funciones, conteniendo secuencias conocidas que permiten por un lado la unión de la librería a las celdas de flujo de secuenciación y sitios de unión para los cebadores de secuenciación. En ocasiones contienen un código de barras, también llamado índice, para identificar muestras y permitir el multiplexado (secuenciación de varias muestras a la vez). En el paso de secuenciación ocurren las reacciones bioquímicas que permiten las lecturas (*reads*) nucleotídicas de cada fragmento de DNA. Actualmente existen dos tipos de secuenciación, las basadas en síntesis o polimerización, que son sistemas dependientes de DNA polimerasas y las basadas en nano-poros, que no dependen de reacciones enzimáticas de polimerización.

Los resultados obtenidos del proceso de secuenciación son archivos informáticos que contienen cientos de miles de *reads* obtenidas durante el proceso. Los tipos de ficheros o archivos generados por las plataformas de secuenciación son SAM/BAM, VCF o FASTQ, siendo el más frecuente este último.

El último paso son los análisis bioinformáticos empleando potentes herramientas bioinformáticas. En este paso es importante el procesado previo al análisis, en donde se deben de eliminar todas aquellas *reads* de mala calidad y los adaptadores empleados durante el proceso de preparación de la librería.

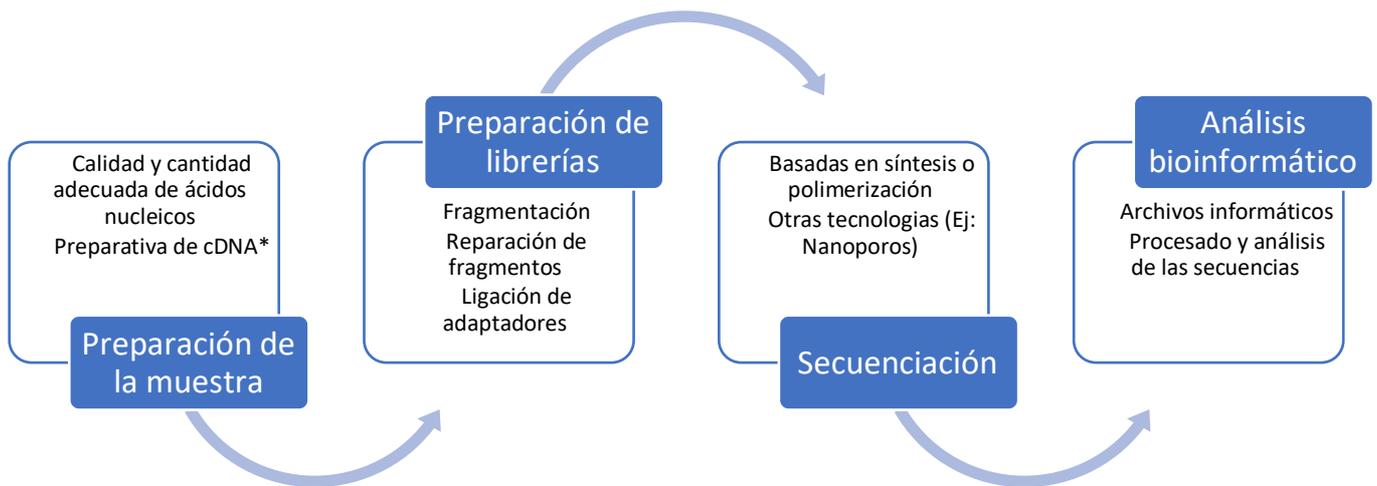
Una vez procesadas las secuencias, se procede a realizar los análisis bioinformáticos de ensamblaje más adecuados (Figura 20).

La aplicación de técnicas de HTS en el diagnóstico de virosis de la vid genera conjuntos de datos muy complejos, dada la gran cantidad de virus y viroides que infectan simultáneamente a esta especie de planta en comparación con otras especies vegetales (Martelli, 2017).

Las técnicas de HTS aplicadas al estudio del viroma de la vid han revelado que muchos virus y viroides no regulados se encuentran de manera habitual en este tipo de plantas, cuestionando así el concepto de lo que es una vid “sana”.

Además de esto, las técnicas de secuenciación masiva han supuesto una revolución en lo referente a la descripción y caracterización de nuevas virosis (Saldarelli *et al.*, 2017a).

Por ello, las técnicas de HTS posiblemente sean la mejor alternativa a las metodologías actuales de diagnóstico y detección, ya que proporcionan una información completa sobre el viroma de la vid y no solo el de una única especie, facilitando así la comprensión precisa de las enfermedades de la vid de etiología viral.



**Figura 20.** Diagrama de flujo sobre los procedimientos generales empleados en las técnicas de secuenciación masiva (HTS).

\*Solo cuando se trata de secuenciación de RNA total





## **2. Justificación y Objetivos**

## **2.1 Justificación**

El proyecto de tesis aborda el estudio y diagnóstico de virosis emergentes de vid, alguna de ellas de gran impacto económico y agronómico.

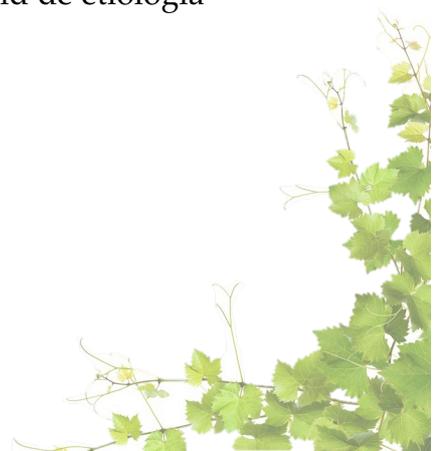
La prevención e identificación temprana de brotes epidémicos de virus emergentes en un cultivo estratégico como la vid es de enorme importancia para salvaguardar la viticultura española.

Por tanto, el estudio de la presencia de virus emergentes en España, el conocimiento de su diversidad genética y el desarrollo de técnicas eficaces de diagnóstico son fundamentales para desarrollar estrategias de prevención y control, en un cultivo basado en la multiplicación vegetativa de variedades tradicionales permitidas en las diferentes Denominaciones de Origen.

## **2.2 Objetivos**

El objetivo general de la presente tesis es conocer la situación de las virosis emergentes de vid en España y desarrollar herramientas que puedan implementar programas de selección sanitaria, certificación y/o erradicación. Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos concretos:

1. Búsqueda de los principales virus emergentes (GPGV, GRLDaV, GAMaV, GVE, GVF, GVT, GRBV y GVCV) en plantaciones españolas de vid con denominación de origen mediante HTS y métodos moleculares basados en PCR.
2. Caracterización molecular de los virus emergentes GPGV, GRLDaV y GAMaV: secuenciación, análisis de la estructura del genoma viral y diversidad genética.
3. Desarrollo de métodos de detección de virus emergentes GPGV, GRLDaV y GAMaV que infectan a la vid.
4. Identificación y caracterización de un desorden vegetativo en vid de etiología desconocida.





# 3. Material y métodos

### 3.1 Material vegetal

Se realizaron prospecciones periódicas aleatorias durante el periodo comprendido entre los años 2017 y 2020 en cinco denominaciones de origen (D.O.): D.O. Utiel-Requena; D.O. Uva de Mesa Embolsada del Vinalopó; D.O. Priorato y D.O. Manchuela. Un total de 820 muestras de vid, de nueve variedades distintas (Tempranillo; Garnacha; Syrah; Bobal; Macabeo; Cabernet Sauvignon; Aledo, Ideal y Crimson Seedless) fueron analizadas para el estudio de virosis emergentes (Tabla 2).

**Tabla 2.** Material vegetal utilizado en la búsqueda de virosis emergentes de la vid, prospectado en el periodo 2017-2020 en cinco denominaciones de origen (D.O.) del levante español

N <sup>ro</sup> . Muestra	Variedades	Denominación de origen	Año
50	Tempranillo	Manchuela	2017
80	Garnacha y Syrah	Priorato	2017
178	Bobal; Macabeo y Garnacha	Utiel-Requena	2017
5	Crimson Seedless	Valencia*	2018
52	Tempranillo; Macabeo	Utiel-Requena	2019
128	Aledo; Ideal	Vinalopó**	2019
86	Bobal, Tempranillo, Cabernet Sauvignon y Syrah	Utiel-Requena	2020
241	Bobal; Chardonay	Valencia	2020

\* Muestras vegetales obtenidas en un huerto privado de la comunidad valenciana (CV); \*\* D.O. Uva de Mesa Embolsada del Vinalopó.

Se emplearon como controles positivos, para GPGV 3 muestras infectadas de Eslovaquia, SK30, SK45 y SK704 (cv. Veltliner) y 2 muestras españolas de plantas de vid mantenidas en invernadero de cuarentena del IVIA originarias de la primera detección del virus en España en la de la D.O. Utiel-Requena, RQ30 y RQ25 (cv. Garnacha y Bobal, respectivamente) (Ruiz-García & Olmos, 2017).

En el caso de GRLDaV, un total de 22 muestras de vid infectadas de diferentes orígenes y variedades fueron seleccionadas como controles positivos: 1 muestra de planta de vid mantenida en invernadero de cuarentena del IVIA originaria de Grecia (cv. Roditis), 16 muestras de Grecia (cv. Dafnia, Mavrothiriko, Moschato Samou, Korinthiaki stafida, Romeiko, Lagorthi, Assyrtiko y Koumariano)

suministradas por la Dra. Maliogka (Universidad Aristóteles de Salónica); 2 muestras de Turquía (cv. Yalova incisi) suministradas por la Dra. Ulubaş Serçe (Universidad Niğde Ömer Halisdemir); 2 muestras de Italia (cv. Bombino Nero) suministradas por el Dr. Minafra (CNR-IPSP); y 1 muestra de Croacia (cv. Ljutun) proporcionada por el Dr. Vončina (Universidad de Zagreb).

El estudio de un desorden vegetativo en vid de etiología desconocida, se realizó en el año 2018, a partir de cinco plantas de vid (cv. Crimson Seedless) de un huerto privado ubicado en la provincia de Alicante (España) donde se recolectaron muestras con una sintomatología particular de enrollado de la hoja. Como controles positivos de los virus GVE y GVF se utilizó 1 muestra de vid (cv. Dafnia), suministradas por la Dra. Maliogka de la Universidad Aristóteles de originaria de Grecia, coinfectada con los virus GVE y GVF. Como control positivo del virus GRBV se empleó 1 muestra de vid (cv Zinfandel) suministrada por el Dr. Jean Sébastien Reynard del centro de investigación Agroscope de Suiza, infectada con GRBV. Como control positivo para la detección de GVT se utilizó la muestra SK704 (cv. Veltliner) originaria de Eslovaquia suministrada por el Dr. M. Glasa de la Academia Eslovaca de Ciencias.

Adicionalmente, para el estudio de detección específica de GRLDaV mediante el método de PCR en tiempo real diseñado en este estudio, se analizaron 65 muestras de vid procedentes de Grecia prospectadas aleatoriamente y suministradas por la Dra. Maliogka de la Universidad Aristóteles de Salónica.

En todos los ensayos se usaron como controles negativos material vegetal de tres variedades de vid (Valenci blanc, Monastrell y Bobal) saneadas en el laboratorio de virología del IVIA y mantenidas en invernadero.



## 3.2 Ensayos con vectores de transmisión

### 3.2.1 Adquisición

Para los ensayos de adquisición realizados con el ácaro *Colomerus vitis*, se recolectaron hojas de vid (cv. Bobal) que presentaban erineas (agallas) producidas por el ácaro *C. vitis*, localizadas en una parcela experimental del IVIA. Tras comprobar la ausencia de GPGV en el material vegetal mediante RT-PCR convencional, de acuerdo con Glasa *et al.*, (2014), y haciendo uso de una lupa binocular M165-C (Leica, Wetzlar, Alemania), se recortaron y aislaron las erineas que contenían *C. vitis*. Se aislaron dos grupos de 5 y 10 ácaros respectivamente y se analizaron mediante el mismo protocolo de RT-PCR mencionado anteriormente para confirmar la ausencia de GPGV. A continuación, se transfirieron las erineas aisladas a hojas de vid infectadas con GPGV (cv. Garnacha) y hojas de vid saneadas libres de GPGV. El periodo de acceso a la adquisición de los *C. vitis* fue de 5 días a 25°C. Transcurrido el periodo de adquisición se aislaron grupos de 15, 10, 5 especímenes, así como insectos individuales para su posterior análisis mediante PCR en tiempo real.

Los ensayos de adquisición con cochinillas se realizaron con las especies *Planococcus citri* y *Pseudococcus viburni*, proporcionadas por el Dr. Francisco Beitia del departamento de Entomología del IVIA. Las cochinillas adultas se recolectaron originalmente de frutos de caqui (*Diospyros kaki* L.) ubicados en Algemesí (Ribera del Xúquer, Valencia). Las colonias de cochinillas se mantuvieron en frutos de limón a 26°C durante 60 días. Durante este periodo, la ausencia de GRLDaV en las cochinillas se confirmó dos veces, mediante métodos de detección basados en PCR convencional y en tiempo real de acuerdo con Yang *et al.* (2003) y Maliogka *et al.* (2015) respectivamente.

A continuación, las cochinillas libres de GRLDaV se transfirieron a hojas de vid tanto infectadas con GRLDaV (cv. Roditis) como sanas (cv. Bobal).

El periodo de adquisición de las cochinillas fue de 48 horas y se realizó a 28 °C de temperatura y 60% de humedad con un ciclo de luz de 12/12 h en una cámara de crecimiento vegetal MLR-350H (Sanyo, Osaka, Japón). Transcurrido este periodo se aislaron nueve réplicas de grupos de 2, 4 y 1 especímenes para su posterior análisis mediante RT-PCR en tiempo real.

Todas las hojas usadas en los ensayos fueron mantenidas durante los periodos de adquisición sobre esponjas humedecidas en bandejas con agua.

### **3.2.2 Transmisión**

Los ensayos de transmisión se realizaron con las especies *P. citri* y *P. viburni*. Para ello se aislaron cochinillas procedentes de grupos positivos para GRLDaV analizados previamente mediante PCR. Se aislaron 6 grupos de cochinillas conformados por 5 especímenes, los cuales fueron colocados en plantas de vid saneadas (cv. Bobal) cultivadas *in vitro*. Las plantas de vid saneadas se cultivaron en medio estéril Lloyd & McCown Woody (MW) (Lloyd & McCown, 1980): 0,25 % (p/v) de MW Plant Medium (DUCHEFA, Países Bajos), 2 % (p/v) de sacarosa, 0,1 % (p/v) PVP-10 y 0,7% (p/v) de agar vegetal a pH 5,8.

El periodo de acceso a la inoculación de las cochinillas en las plantas de vid saneadas fue de 2, 3 y 4 días, en una cámara de crecimiento vegetal (Sanyo MLR-350H) con una de humedad del 70%, a 25°C y un fotoperiodo de 16/8 h. Transcurrido el periodo de inoculación, las cochinillas fueron eliminadas manualmente y el material vegetal se analizó mediante el método de PCR en tiempo real para la detección de GRLDaV desarrollado en este estudio.



### 3.3 Preparación de extracto crudo y purificación de ácidos nucleicos

El material vegetal de cada una de las muestras analizadas en la presente tesis se procesó de la siguiente manera: el tejido vegetal se colocó en bolsas de plástico individuales (Bioreba, Reinach, Suiza) y se trituró en tampón de extracción (PBS que contenía 0,2% de DIECA y 2% de PVP-10) en una proporción de 1:5 (p/v). El homogeneizado se procesó para su análisis por PCR, como se detalla a continuación, y también se empleó para la purificación de ácidos nucleicos.

Para su análisis directo por PCR se realizó una dilución 1:50 del homogeneizado en H<sub>2</sub>O, se centrifugó a 20.000 × g durante 1 min y se incubó a 95 °C durante 10 minutos, conservándose en hielo hasta su análisis.

La purificación de RNA o DNA se realizó a partir de 200 µl del homogeneizado utilizando los kits comerciales de purificación de *RNA* o *DNA total Plant/Fungi* (Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canadá) siguiendo las instrucciones indicadas en el manual del fabricante, incluido el tratamiento con DNasa como paso adicional recomendado, utilizando el Kit de *RNase-Free DNase I* (Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canadá). La concentración y la calidad de los ácidos nucleicos purificados se determinó mediante espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro DeNovix DS-11 (DeNovix Inc., Wilmington, DE, EE. UU.) Todas las muestras de ácidos nucleicos purificados fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis posterior.

La purificación de ácidos nucleicos extraídos de insectos se realizó mediante un kit de purificación de *DNA total Plant/Fungi* (Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canadá) con ligeras modificaciones. Los insectos se colocaron individualmente y en grupos en tubos a los que posteriormente se añadieron 400 µl de tampón PBS. La suspensión se agitó en un vórtex durante 5 minutos en presencia de perlas de vidrio de 212 a 300 µm de diámetro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

Tras realizar una centrifugación a 10.000 x g durante 5 min, se transfirieron 200  $\mu$ l del sobrenadante a un tubo nuevo a partir del cual se continuó el procedimiento de extracción siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.4 Secuenciación**

#### **3.4.1 Secuenciación Sanger**

Se diseñaron cebadores específicos en diferentes regiones genómicas conservadas de cada virus para la secuenciación parcial de las regiones genómicas empleadas en los estudios filogenéticos y de variabilidad genética (Tabla 3).

El análisis de las temperaturas de fusión y estructuras secundarias de todos los oligonucleótidos diseñados se realizó utilizando la herramienta disponible *online Oligo Analyzer Tool* (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, EE. UU). En el caso de amplificaciones a partir de RNA, se empleó el kit *AgPath-ID One-step RT-PCR* (Ambion Inc., Austin, TX, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todas las mezclas de reacción de RT-PCR contenían los cebadores a las concentraciones indicadas en la Tabla 3, así como 3  $\mu$ l de RNA purificado. Los protocolos de RT-PCR consistieron en una etapa de transcripción inversa a 45 °C durante 30 minutos, una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos y 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, 30 segundos a la temperatura de hibridación correspondiente y elongación a 60 °C durante 1 minuto).





## Material y métodos

En el caso de las amplificaciones a partir de DNA, estas se llevaron a cabo haciendo uso de la enzima *Platinum Taq DNA polimerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las mezclas de reacción de PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ l conteniendo los cebadores a las concentraciones indicadas en la Tabla 3 y 3  $\mu$ l de DNA purificado.

Las condiciones de amplificación empleadas en los protocolos de PCR consistieron en un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, 30 segundos a la temperatura de hibridación indicada en la tabla 3 y 48 segundos de elongación a 72°C). Todos los productos de amplificación de PCR y RT-PCR fueron purificados haciendo uso del kit *mi-PCR Purification Kit* (Metabion International AG, Martinsried, Alemania) y fueron secuenciados en ambas direcciones mediante tecnología Sanger.

**Tabla 3.** Cebadores empleados en la secuenciación parcial de los virus emergentes estudiados en la presente tesis, se indica la temperatura de hibridación óptima de cada pareja ( $T_a$ ), la concentración empleada en la amplificación (nM), la región diana y el tamaño amplificado (nt). \*Contig asociado a *Penicillimonavirus gammaplasmopara*.

Virus	Cebador	Secuencia (5'-3')	$T_a$ (°C)	[nM]	Diana	Tamaño (nt)
GAMaV	GAMaV3755-F	ATCCTCACCAACTCCC	55	800	Poliproteína	230
	GAMaV-3985-R	GTTGGAAGTGGTG				
	GAMaV-6010F	CCCTCCTCCTAGCGACGACC	60	800	CP	417
	GAMaV-6426R	GGTTGAGACGGCGGAGATC				
GPGV	GPGV-6474F	TTCTGGTGATCCAATGGTAAAGA	55	900	MP/CP	438
	GPGV-6912R	ATTGCAAAGGCCGCACACACTTG				
	GPGV-RT-F	GTCTAAATCTGGCTGTGCTGAAAAATAGTGC	50	900	MP/CP	228
	GPGV-RT-R	CCTGAGGTCCCTTCAACTGC				
	Det-F*	TGGTCTGCAGCCAGGGGACA	55	500	CP	588
Det-R*	TCACGACCGGCAGGGAAGGA					
GRLDaV	GRLDaV-RNaseH-F	AGCCCACTCTATGCYAARACAAG	56	500	ORF3/ORF4	775
	GRLDaV-RNaseH-R	TGCTTTCTTTGCTGACTCAGCTTC				
C-II*	C-II-1F_Detection	GTC CGC GCA AAA ATA AGA TAC	55	500	3'-UTR/pV	554
	C-II-554R_Detection	AGC ACG TTC AGA TTC TGA GTG				
	C-II-17F	GAT ACA GAC AGA CTA ACT ATG ATG AAG	55	500	3'-UTR/pV	538
	C-II-554R_Detection	AGC ACG TTC AGA TTC TGA GTG				
	C-II-479F	ACT CTC ATA GTC ACT TTT GTC G	55	500	E2/pV	478
	C-II-957R	GAA CCT CAT CGA TAA GA CAA CC				
	C-II-1349F	GGA TCA GTA GGG TGA AGA GAA G	55	500	pIV/pV	568
	C-II-1917R	TCA GTA TCT ATG AGT TAC GGA AAG A				
	C-II-1796F	AGT TCC AGA TAG TTT CTC TCT CC	55	500	pII/pIII	599
	C-II-2395R	GAA ACT CTC TTT TGA CCC TTG C				
	C-II-2769F	AGG AAT CTT GTA GGT GTC AAT G	55	500	E2/pII	709
	C-II-3478R	CTT GTA CCA CCG CTC CAG				
	C-II-3321F	GTT GAT GGT GCG AGA ATA T	55	500	pI/pII	417
	C-II-3738R	ATA CTC AAC TGA TGG ATC ACG TT				
	C-II-3406F	TGC TCG ACG TCC TTG ATC AG	56	500	pI/pII	662
	C-II-4068R	AAC AAA TGA AGC GTG GCC T				
	C-II-3716F	AAC GTG ATC CAT CAG TTG AGT AT	55	500	pI	380
	C-II-4096R	AGT CTA GTC AAG CAA GAT GAG GA				
	C-II-3999F	ACG TTC GTG TTT ACA AAA GGC	55	500	5'-UTR/pI	531
	C-II-4530R	AAA GTG CGA AAG TGA CCC				
C-II-3999F	ACG TTC GTG TTT ACA AAA GGC	55	500	5'-UTR/pI	565	
C-II-4564R	CGC AAA AAT AAG ATA TAG ACA GAC GA					
C-I-6F_Detection	GAG TGA CAG TGG TTT TTT CAA AA	56	500	3'UTR/RdRp	574	
C-I-580R_Detection	CGC ATC ACT CAG TAG AAC TTA TC					
C-I-981F	GTC AGC CAG TCC TCC TAA	56	500	RdRp	575	
C-I-1556R	TTT GCT GGT GAG GAC ATA AC					
C-I-1495F	ATG GCC CTA CAA CCG AGA G	57	500	RdRp	542	
C-I-2037R	CGC ATC TAA AGA GTG TGT TTC A					
C-I-1938F	GTA TCC TCG TGT ATC AGC TAA C	56	500	RdRp	687	
C-I-2625R	GGA ACA CGG CTA CAA GTT AG					
C-I-2498F	GAG TGT AGG CTA TGT TAT CTA AGA G	56	500	RdRp	632	
C-I-3130R	ATA TCT CTC CGC TAC TCA ACC					
C-I-3433F	GGC AGT AAC AAT GCC ATC AAG A	56	500	RdRp	581	
C-I-4014R	GGG AGG GTT TGA AGG ACT GAA					
C-I-3911F	ACG AGG TGA TTA TAT TGT TAA GCA T	56	500	RdRp	632	
C-I-4543R	AGC TTC TCA ACA GAC GGA ACT T					
C-I-4427F	GCT TGA ATT CTC GTT CCT TTG	57	500	RdRp	683	
C-I-5110R	CTG CAT ATA CGA GAA TGA TTG TCA					
C-II-5012F	TGG CAC ACA ATT TTG TCA CAC TT	57	500	RdRp	602	
C-II-5613R	GTT AGT TGA AGA AGC CCT GTG T					
C-I-5527F	TTA TTT AAA CGA TTA GAC ACA CCT TTG	56	500	5'-UTR/RdRp	541	
C-I-6068R	ATT ATT CGACGCG ATT GTG CGG T					
C-I-5527F	TTA TTT AAA CGA TTA GAC ACA CCT TTG	56	500	5'-UTR/RdRp	567	
C-I-6094R	GCA CAC CAA AGG AAG GAA ATA CAG					

### 3.4.2 Secuenciación masiva

La secuenciación mediante HTS se realizó en todos los casos a partir de 1-2  $\mu\text{g}$  de RNA total purificado del homogeneizado.

La integridad del RNA total se analizó mediante el bioanalizador Agilent Technologies 2100 system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), considerando como criterio válido para la secuenciación valores de número de integridad del RNA (RIN) comprendidos en un rango de 3.5 a 8.

La depleción del RNA ribosómico y la preparación de las librerías se realizaron empleando el kit TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep (Plant) siguiendo la guía de preparación de muestras de RNA total TruSeq® (Illumina San Diego, CA) revisión E (Illumina, 2016). La plataforma utilizada para la secuenciación fue NovaSeq 6000 (Illumina San Diego, CA).

Los datos crudos de las muestras de vid seleccionadas para su secuenciación se sometieron a un proceso de control de calidad, eliminación de adaptadores y sustracción del genoma del hospedador (RefSeq GCF\_000003745.3\_12X, FM179380 y DQ424856) utilizando el programa bioinformático CLC Genomics Workbench 10.1.1 (Qiagen Bioinformatics, Hilden, Alemania). El control de calidad de las *reads* se realizó empleando la herramienta específica del *software* que realiza un informe gráfico para visualizar la calidad y la contaminación con adaptadores de las *reads*. Con los datos obtenidos se procedió a eliminar las secuencias de baja calidad y los adaptadores. Los parámetros incluyeron la eliminación de *reads* por debajo del valor de calidad de 0,05 y eliminación de *reads* con más de 2 nucleótidos indeterminados. Se empleó el listado de adaptadores de Illumina y se verificó su presencia sobre un subconjunto aleatorio de 1.000 *reads*. Una vez confirmada la presencia de los adaptadores se eliminaron con la herramienta disponible en el *software*, seleccionando el listado concreto de adaptadores.

Una vez eliminados se volvió a realizar un análisis de calidad de las *reads*. En caso necesario se procedió a recortar de los extremos 5' y 3' el número de nucleótidos necesarios para obtener unas *reads* limpias y de calidad. Los parámetros para la sustracción genómica incluyeron un coste de desapareamiento de valor 2, un coste por inserción de valor 3 y de deleción de valor 3, con una fracción de longitud para el mapeo mínima de 0,7 y una similaridad mínima de lectura del 0,8.

Las secuencias restantes, que no mapearon con el genoma de la planta, fueron utilizadas para ensamblar *contigs de novo* utilizando el algoritmo de ensamblaje del CLC Genomics Workbench 10.1.1 (Qiagen Bioinformatics, Hilden, Alemania) con los siguientes parámetros: coste de desapareamiento (*mismatch*) de valor 2, un coste por inserción de valor 3 y de deleción de valor 3, con una fracción de longitud para el mapeo mínima de 0,7 y una similaridad mínima de lectura del 0,8; reanálisis de contigs y verificación de su corrección; tamaño de palabra y de burbuja automáticas, tamaño mínimo del *contig* ensamblado de 200 nt, con auto-estimación de la distancia entre las *reads* por pares y generar armaduras para ensamblar grandes regiones repetidas que no están abarcadas por *reads* individuales pero sí por los *reads* pares.

De forma paralela, se realizaron mapeos sobre genomas de referencia o sobre los *contigs* obtenidos *de novo* para su extensión, empleando los programas Geneious prime 2020 (Biomatters Ltd., Auckland, Nueva Zelanda). Las *reads* limpias tras el control de calidad se utilizaron para realizar estos mapeos alineándolas con las secuencias genómicas disponibles en las bases de datos o los *contigs* mediante el algoritmo *Geneious Read Mapper Algorithm* implementado en el *software* Geneious Prime 2020 (Biomatters Ltd., Auckland, Nueva Zelanda) con los parámetros siguientes: calidad mínima de las *reads* (QC) para el mapeo de 20, sin permitir *gaps*, identidad de superposición mínima del 75-90 %, discrepancias máximas por *read* del 10 % y búsqueda exhaustiva de *reads*.

De forma iterativa el proceso se repitió hasta ir extendiendo los contigs o aumentar la cobertura sobre el aislado mapeado lo máximo posible.

### 3.5 Cultivo y transformación de *Escherichia coli*

Los métodos microbiológicos empleados se centraron en la transformación de la bacteria *Escherichia coli* con vectores o plásmidos que contenían secuencias virales de interés para el presente estudio. El cultivo de *E. coli* se realizó en medio LB (Lysogenia Broth) Miller (Condalab): 1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl y 1,5% (p/v) agar bacteriológico (para medio sólido) a pH 7,5 y esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 120 °C. Para la selección de bacterias que contenían plásmidos se suplementó el medio con 50 µg/ml del Ampicilina (Sigma-Aldrich).

Las células competentes se prepararon a partir de 100 ml de un cultivo de la cepa de *E. coli* XL1-Blue incubado a 37 °C en agitación (150 rpm) hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0.5. Las células se recogieron por centrifugación en frío (4°C) a 4000 rpm durante 10 minutos, se lavaron en 30 ml de la disolución TF1 (0.1 M de RbCl, 50 mM de MnCl<sub>2</sub>, 30 mM KCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) glicerol, pH 5.8) enfriada en hielo, y fueron resuspendidas en 4 ml de disolución TF2 (10 mM MOPS pH 7, 10 mM RbCl,, 75 mM CaCl<sub>2</sub> y 15 % (v/v) glicerol) también enfriada sobre hielo. La suspensión de células competentes se dividió en alícuotas de 200µl que se almacenaron a -80 °C hasta su uso para la transformación. Para la transformación de las células competentes de *E. coli*, a una alícuota de 200 µl de suspensión se le añadió el DNA a transformar y se incubó en hielo durante 10 minutos. A continuación, la suspensión fue sometida a un choque térmico de 1 minuto a 45 °C y enfriada rápidamente en hielo durante 1 minuto. A continuación, se añadió 1 ml de medio LB líquido y se incubó a 37°C durante 1h. Transcurrido este tiempo se sembraron 200 µl de diferentes diluciones en placas de LB agar suplementado con ampicilina. Las placas se incubaron a 37 °C hasta la aparición de transformantes.

### 3.6 Detección de virus de vid

Para la detección de GRBV, se utilizó el protocolo de PCR convencional descrito por Poojari *et al.*, (2013) utilizando la pareja específica de cebadores GRLaV-For / GRLaV-Rev, que amplifica un fragmento de 557 nt que abarca parte de la región intergénica y la proteína de la cubierta V2. Adicionalmente, en el caso de muestras que presentaban síntomas de manchas rojas similares a las asociadas al complejo GLC, se realizaron enriquecimientos de secuencias de DNA de doble cadena circular mediante amplificación RCA aleatoria (*random-RCA*) previo a la amplificación por PCR. Para el *random-RCA* se empleó el kit *illustra™ TempliPhi™ DNA Amplification* (Cytiva, Amersham, Reino Unido) siguiendo las instrucciones indicadas en el manual del fabricante y empleando 2 µl de DNA como molde.

La detección de GVT se realizó mediante RT-PCR convencional empleando la pareja de cebadores específicos GVT\_7632F (5'-GTG GTC CTC GTT AGG TGC AG-3') / GVT\_8534R (5'-CGG CAA GAG TTC CAA CTA GC-3') diseñados por Glasa *et al.* (2018). Para la detección de los vitivirus GVE y GVF se emplearon los cebadores GVEup (5'-ATG GAG TCA AAA GCG ATC MG-3) y GVEdo (5'-ACC TGT GAC TGA GCA TCA AAT AC-3') y GVF\_F\_4521 (5'-TGT GTG GGC KAA RAC ATA TG-3') y GVF\_R\_5190 (5'-ATC AGA AAA GAT GCT MCT CAC CT-3') diseñados para protocolos de detección por RT-PCR de estos virus (Panailidou *et al.*, 2019).

Para la detección de GVCV se utilizó una PCR convencional empleando los cebadores GVCV-F1 (5'-CAC GTT TCA AAG AAA GAT GGA C-3') / GVCV-R1 (5'-ATC CKT CCA TGC AWC CGT CAG-3') diseñados por Zhang *et al.*, (2011). La detección de GPGV se llevó a cabo mediante la RT-PCR en tiempo real descrita en el apartado 3.10.1.



## Material y métodos

Para la confirmación de la presencia de GPGV se emplearon dos protocolos de RT-PCR convencional, utilizando las parejas de cebadores Pg-Mer-F1 (5'-GGA GTT GCC TTC GTT TAC GA-3') / Pg-Mer-R1 (5'-GTA CTT GAT TCG CCT CGC TCA-3') y GPGV-5637F (5'-ATT GCG GAG TTG CCT TCA AG-3') / GPGV-5939R (5'-CTG AGA AGC ATT GTC CCA TC-3') descritos por Beuve *et al.*, (2015) y Glasa *et al.*, (2014) respectivamente.

Para la detección de GRLDaV se empleó la PCR en tiempo real descrita en el apartado 3.10.2. La confirmación de la presencia de GRLDaV se llevó a cabo utilizando dos protocolos de PCR, uno convencional y otro en tiempo real, con las parejas de cebadores, Badna-R-Up (5' GAA GGA ATT GAA TCT CCA GCA GCA GG 3') y Badna-R-Do (5' CTC TGC TAC ACC AAG TGA TAG ATT GTT GAG 3') para la PCR a tiempo real (Maliogka *et al.*, 2015) y Badna-FP (5' ATG CCI TTY GGI AAR AAY GCI CC 3') y Badna-RP (5' CCA YTT RC AIA CIS CIC CCC AIC C 3') para la PCR convencional (Yang *et al.*, 2003).

La detección de grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1), grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2), grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), grapevine fleck virus (GFkV), grapevine fanleaf virus (GFLV) y arabis mosaic virus (ArMV) se realizó mediante RT-PCR en tiempo real, según los protocolos publicados que se detallan a continuación. La presencia de GLRaV-1, GLRaV-3, GFkV, GFLV y ArMV se analizó según Bertolini *et al.* (2010). La detección de GLRaV-2 se llevó a cabo según Osman *et al.* (2007).

Por otra parte, para la detección de virus emergentes de vid a partir de los datos de HTS, se utilizaron aquellos *contigs* ensamblados *de novo* mayores de 200 nt y se analizaron mediante *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Se consideró una detección fiable cuando se presentaban porcentajes de identidad altos (>90%) y con unos valores de *e-value* menores a  $10^{-3}$ .

Para los análisis BLAST se utilizaron tres tipos de base de datos. Por un lado, la base de datos disponible en la herramienta del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) disponible en línea (denominada base de datos *on-line*) y accesible mediante el siguiente enlace <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Por otro lado, se descargaron y utilizaron genomas de referencia (RefSeq) de virus, viroides y hongos disponibles en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/> (denominada base de datos RefSeq).

El periodo de acceso tanto a la base de datos *on-line* como RefSeq estuvo comprendido entre los años 2016-2021. Además, se diseñó una base de datos local, elaborada con todas las secuencias completas y parciales de virus pertenecientes a las familias *Alphaflexiviridae*; *Betaflexiviridae*; *Bromoviridae*; *Bunyaviridae*; *Caulimoviridae*; *Closteroviridae*; *Endornaviridae*; *Fimoviridae*; *Geminiviridae*; *Luteoviridae*; *Partitiviridae*; *Phenuiviridae*; *Potyviridae*; *Reoviridae*; *Secoviridae*; *Tombusviridae*; *Tymoviridae* y *Virgaviridae* actualizada periódicamente a partir de los datos depositados en el NCBI.

Por último, la búsqueda de dominios conservados en secuencias de nucleótidos y proteínas se realizó con la herramienta *on-line* del NCBI accesible mediante el siguiente enlace <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>. Todos los análisis de búsqueda de dominios conservados se realizaron contra la base de datos NCBI\_Curated 17937 PSS.



### 3.7 Alineamiento de secuencias y análisis filogenéticos

El alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas se realizó usando el algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implementado en el programa bioinformático Mega X (Kumar *et al.*, 2018). Las secuencias nucleotídicas empleadas para los alineamientos incluyeron genomas virales completos y/o parciales accesibles en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) en el periodo comprendido entre los años 2017 y 2021. Los números de acceso todas las secuencias empleadas se encuentran disponibles en el anexo 8.2.

La elaboración de todos los árboles filogenéticos se realizó mediante estimación por máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) el vecino más próximo (*Neighbor-Joining*). El método de *bootstrap* se utilizó para analizar la robustez y fiabilidad de los nodos resultantes; todo ello seleccionando el mejor modelo de sustitución de nucleótidos implementado en el programa bioinformático Mega X (Kumar *et al.*, 2018).

### 3.8 Diseño de cebadores y sondas TaqMan de detección

El diseño de los cebadores para la amplificación específica de GAMaV se realizó a partir del alineamiento de cinco genomas completos. Cuatro genomas correspondían a los aislados GV30 (KX354202) de USA, CS (KY123917) y 16GVP031 (MK253012) de Francia y 14G480 (MZ344576) de Canadá, todos ellos disponibles en la base de datos del NCBI en 2020, y otro genoma correspondiente al aislado TS1 (MT459830) recuperado en este estudio.

El diseño de los cebadores y las sondas empleados para la detección específica de GPGV se realizó a partir del alineamiento de 96 secuencias parciales y completas disponibles en la base de datos del NCBI hasta el año 2017 (Anexo 8.2).

Adicionalmente, para el protocolo de detección de GPGV se diseñaron dos cebadores específicos para un gen de expresión constitutiva de la vid (fosfoenolpiruvato carboxilasa, PEP), utilizado como control interno en estudios de expresión génica (Borges *et al.*, 2014).

El diseño de los cebadores y sonda empleados para la detección específica de GRLDaV, se realizó a partir del alineamiento de 11 secuencias nucleotídicas correspondientes a todas las secuencias de genomas completos disponibles en la base de datos del NCBI hasta el año 2020 (aislados W4, BN y VLJ-178) y 8 secuencias parciales, secuenciadas en este estudio con los cebadores GRLDaV-RNaseH-F y GRLDaV-RNaseH-R, de diferentes aislados griegos y turcos. (Anexo 8.2).

### **3.9 Generación de rectas patrón para la cuantificación mediante RT-PCR y PCR**

La generación de rectas patrón de RT-PCR en tiempo real del virus GPGV, se realizó amplificando por RT-PCR convencional una secuencia nucleotídica específica del genoma de GPGV (438 nt), conteniendo la secuencia diana del ensayo de RT-PCR en tiempo real, utilizando los cebadores GPGV-6474F/ GPGV-6912R mediante RT-PCR y siguiendo las condiciones antes mencionadas. El fragmento de 438 pb de DNA amplificado fue purificado e insertado en el vector pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, EE. UU.) (pGEM-T- GPGV-6474F/6912R). A continuación, el plásmido pGEM-T- GPGV-6474F/6912R fue transformado en *Escherichia coli*.

Se extrajo el plásmido de las células transformantes mediante el kit mi-Plasmid Miniprep (Metabion International AG, Martinsried, Alemania) y se evaluó por secuenciación Sanger la presencia, secuencia y orientación del fragmento, haciendo uso de los cebadores T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') y

SP6 (5'-GAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC-3'). Posteriormente el plásmido fue linearizado mediante restricción con Sal I y se usó como molde en un ensayo de transcripción in vitro, utilizando RNA polimerasa T7 (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japón).

El producto de esta reacción fue sometido a digestión haciendo uso del kit *RNase-Free DNase* (Promega Corporation, Madison, EE. UU.) a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, el RNA transcrito se purificó usando una columna de purificación del kit de purificación de *RNA total Plant/Fungi* (Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canadá) y se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro DeNovix DS-11 (DeNovix Inc., Wilmington, DE, EE. UU.). La cantidad de RNA transcrito en picomoles se determinó considerando el peso molecular promedio de un ribonucleótido (340 Da) y el número de bases del transcrito (Nb), aplicando la siguiente fórmula matemática:  $\text{pmol de ssRNA} = (\mu\text{g de ssRNA} \times 10^6) / (340 \times \text{Nb})$ . El número de moléculas de transcrito se estimó utilizando la constante de Avogadro ( $6,023 \times 10^{23}$  moléculas/mol). Se prepararon tres réplicas de diluciones decimales seriadas de los transcritos ( $3 \times 10^8$  a 30 moléculas de RNA), que se utilizaron para generar la recta patrón.

La generación de rectas estándar de PCR en tiempo real del virus GRLDaV, se realizó amplificando un fragmento de la región RNaseH del virus de 196 pb mediante PCR convencional, utilizando los cebadores GRLDaV-F2 y GRLDaV-R1. El DNA amplificado fue purificado siguiendo las condiciones antes mencionadas. A continuación, el fragmento de DNA se insertó en el vector pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, OH, EE. UU.) (pGEM-T-GRLDaV-F2/R2) y se clonó en *Escherichia coli* XL1-Blue.

Las colonias transformantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina (50  $\mu\text{g/ml}$ ).

La extracción de plásmido se realizó utilizando el kit mi-Plasmid Miniprep (Metabion International AG, Martinsried, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se cuantificó como se ha mencionado anteriormente.

La cantidad de DNA plasmídico se determinó en picomoles aplicando la siguiente fórmula matemática:  $\text{pmol de dsDNA} = (\mu\text{g de dsDNA} \times 10^6) / (660 \times \text{Nbp})$ , considerando el peso molecular promedio de una pareja de nucleótidos (660 Da) y el número de pares de bases del plásmido con el inserto (Nbp). El número de moléculas de DNA plasmídico se estimó utilizando la constante de Avogadro ( $6.023 \times 10^{23}$  moléculas/mol). Se prepararon tres réplicas de diluciones decimales seriadas (de  $3 \times 10^{10}$  a 3 moléculas de DNA plasmídico) para generar la recta patrón.

Para el cálculo de la eficiencia de amplificación de todas las rectas patrón de calibración se utilizó la pendiente, aplicando la fórmula matemática:  $\text{eficiencia de amplificación} = (10^{(-1 / \text{pendiente})}) - 1$  (Bustin, 2000).

### **3.10 Diseño de RT-PCR convencional y qPCRs en tiempo real basadas en sondas TaqMan**

#### **3.10.1 Detección de GAMaV**

La detección del virus GAMaV se realizó mediante RT-PCR convencional en dos pasos. Para el primer paso de retrotranscripción (RT) se empleó el kit *Thermo Scientific™ RevertAid H Minus Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción contenía 20 U de inhibidor de RNasa *RiboLock*, 500 nM de cada uno de los cebadores GAMaV-6010F y GAMaV-6426R, 200 U de transcriptasa inversa *RevertAid H Minus* (Thermo Fisher) y 5  $\mu\text{l}$  de RNA (previamente desnaturalizado a 95 °C).

Las condiciones de RT se realizaron a 42 °C durante 1 hora, seguido de 10 minutos a 70 °C para la inactivación de la enzima. Para el segundo paso de amplificación de cDNA mediante PCR, se empleó el kit *Platinum™ Taq DNA Polymerase, DNA-free* (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción contenía 1 U de DNA polimerasa *Platinum Taq*, 500 nM de cada uno de los cebadores GAMaV-6010F y GAMaV-6426R; 0,75 µl del aditivo *KB Extender* y 3 µl de cDNA. El protocolo de amplificación por PCR consistió en un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos seguido de 40 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C, hibridación durante 30 segundos a 60 °C y elongación 30 segundos a 72 °C). Tanto la RT como la PCR se realizaron en un termociclador *Veriti 96-well thermal cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU).

### 3.10.2 Detección de GPGV

En el caso de la nueva RT-PCR cuantitativa en tiempo real basada en sonda TaqMan para la detección de GPGV, los ensayos se llevaron a cabo en tres termocicladores: StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.); QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland), utilizando el kit AgPath-ID One-step RT-PCR (Ambion Inc., Austin, TX, EE. UU.). La mezcla de reacción contenía 150 nM de la sonda GPGV-genprobe y 0,9 µM de cada uno de los cebadores GPGV-RT-F y GPGV-RT-R (reacción *singleplex*) o 150 nM de la sonda GPGV- genprobe, 50 nM de la sonda PEP-probe, 900 nM de cada uno de los cebadores GPGV-RT-F y GPGV-RT-R y 100 nM de cada uno de los cebadores PEP-F1 y PEP-R1 (reacción *duplex*). Tanto las reacciones *singleplex* como *duplex* contenían 3 µl (60 ng) de RNA purificado.

El protocolo de RT-PCR consistió en un paso de transcripción inversa a 45 °C durante 10 minutos y un paso de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación (15 segundos de desnaturalización a 95 °C y 1 minuto de hibridación y elongación a 60 °C). La lectura de fluorescencia y el análisis de datos se realizó utilizando el *software* Light Cycler 1.5 (Roche, Basel, Switzerland). El ajuste del ciclo umbral (*Cycle threshold*) se ajustó manualmente de acuerdo con el ruido de fondo obtenido en cada reacción de amplificación.

### 3.10.3 Detección de GRLDaV

El método de PCR en tiempo real basado en sonda TaqMan para la detección de GRLDaV desarrollado en este estudio se realizó en tres termocicladores en tiempo real diferentes: StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.); QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y LightCycler 480 (Roche, Basilea, Suiza). En todos los casos se utilizó el kit Premix Ex Taq para PCR en tiempo real basado en sondas (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japón), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La mezcla de reacción contenía 250 nM de la sonda, 350 nM de cada uno de los cebadores y 5 µl de DNA molde (70 ng) o 5 µL de extracto crudo en un volumen de reacción total de 20 µL. Para reacciones realizadas en los Instrumentos Applied Biosystems, se agregaron 0.4 µL de ROX *Reference Dye* (50X) como fluoróforo de referencia. La reacción de PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación (15 segundos de desnaturalización a 95 °C y 1 minuto de hibridación y elongación a 60 °C). La lectura de fluorescencia y el análisis de datos se realizaron utilizando el *software* correspondiente para cada uno de los termocicladores. El ajuste del Ct se realizó manualmente de acuerdo con el ruido de fondo obtenido en cada reacción de amplificación.

### 3.11 Validación de los métodos de PCR en tiempo real desarrollados

#### 3.11.1 Sensibilidad analítica

Para la evaluación de la sensibilidad analítica del método desarrollado para la detección de GPGV mediante RT-PCR en tiempo real, se prepararon tres réplicas de diluciones decimales seriadas de extractos de plantas infectadas con GPGV diluidas en extractos de plantas sanas. De igual forma se comparó la técnica con otro protocolo de RT-PCR descrito, basado en una de RT-PCR en tiempo real SYBR Green dirigido a dos regiones genómicas de GPGV, RdRp y CP (Bertazzon *et al.*, 2017). La sensibilidad analítica de la PCR en tiempo real desarrollada para la detección de GRLDaV se evaluó utilizando tres réplicas de extractos crudos y DNA purificado a partir de material vegetal infectado con GRLDaV diluido en extracto de la planta sana (diluciones decimales seriadas). De igual manera, se comparó el nuevo método de detección de GRLDaV con otros dos métodos basados en PCR convencional y en tiempo real ya descritos (Yang *et al.*, 2003; Maliogka *et al.*, 2015).

#### 3.11.2 Especificidad y selectividad analítica

##### 3.11.2.1 Detección de GPGV

La inclusividad y selectividad del método desarrollado para la detección de GPGV se evaluaron mediante el análisis de ocho muestras de vid infectadas de diferentes orígenes geográficos y cuatro variedades diferentes: 3 aislados de Eslovaquia (SK30, SK45 y SK704) cv. Veltliner, tres aislados de Grecia, Tra7, Tra9 y Amb1 (cv. Tragana y Assyrtico) y dos aislados españoles, RQ30 y RQ25 (cv. Bobal).

La exclusividad fue evaluada analizando ocho muestras (M2, U24, R1, R35, R5, R3, Pin1 y TS1) de vid, de las variedades Marsaoui, Bobal, Red Globe, Tempranillo, Razzegui y Crimson Seedless, infectadas por distintos virus comunes de vid, detectados mediante HTS, tal y como se ha descrito anteriormente.

### **3.11.2.2 Detección de GRLDaV**

La inclusividad y selectividad del método de detección desarrollado para la detección de GRLDaV se evaluó mediante el análisis de 22 muestras de vid infectadas de diferentes orígenes geográficos y 14 variedades diferentes: 17 aislados procedentes de Grecia (G47 3PR, R5, R7, R8, R11, R12, R14, BAK-27, Koum, D2-1, HL-1, G4-1, G14-2, E3-2, P3, P4 y Auth-48), cv. Roditis, Dafnia, Mavrothiriko, Moschato Samou, Korinthiaki stafida, Romeiko, Lagorhi, Assyrtiko y Koumariano; 2 aislados de Turquía (53 y Mahmood), cv. Yalova incisi; 2 aislados italianos (BN GRLDaV 3005 y BN GRLDaV 1405), cv. Bombinero; y 1 aislado de Croacia (VLJ-178), cv. Ljutun.

La exclusividad fue evaluada analizando ocho muestras (M2, U24, R1, R35, R5, R3, Pin1 y TS1) de vid, de las variedades Marsaoui, Bobal, Red Globe, Tempranillo, Razzegui y Crimson Seedless, infectadas por distintos virus comunes de vid, detectados mediante HTS, tal y como se ha descrito en el apartado 3.11.2.1

### **3.11.3 Repetibilidad y reproducibilidad**

Para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad de ambas técnicas de PCR en tiempo real diseñadas para la detección de GPGV y GRLDaV, se seleccionaron siete muestras positivas para GRLDaV y tres para GPGV con los títulos virales más bajos. Los extractos crudos de DNA o RNA purificados de las muestras seleccionadas se analizaron en nueve repeticiones técnicas utilizando tres termocicladores diferentes, QuantStudio 3 real-time PCR system Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y LightCycler 480 (Roche, Basilea, Suiza).

Para cada uno de los instrumentos se realizaron 3 repeticiones independientes, realizadas en diferentes días y por diferentes operadores.

Las repeticiones técnicas incluyeron 3 repeticiones para cada muestra. Se calcularon los valores medios de Cts y los coeficientes de variación.

### **3.12 Aislamiento de partículas virales**

La purificación de viriones se realizó a partir de extractos vegetales de vid. Para ello se trituraron veinte gramos de tejido foliar en 30 ml de tampón frío de extracción PBS que contenía 0,2% de DIECA y 2% de PVP-10 y 150 mM NaCl. El extracto se centrifugó a baja velocidad a 5000 x g durante 30 minutos en una centrifuga Beckman Coulter (tipo de rotor JA-20). El sobrenadante recuperado de dicha centrifugación fue transferido a un tubo de ultracentrífuga de policarbonato (Ref.: 355618 Beckman Coulter) y centrifugado a 80.000 x g durante 1 hora en una ultracentrífuga Beckman L-80 (tipo de rotor TFT 50.38). Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 3 ml de tampón Tris-HCl 150 mM, NaCl 10 mM y EDTA 1 mM. A continuación, la suspensión se depositó en la parte superior de un gradiente continuo de sacarosa (30-70%) preparado en tubos de ultracentrífuga de policarbonato (Ref.: 355603 Beckman Coulter), y se centrifugó a 214.000 x g durante 20 horas en una ultracentrífuga Beckman L-80 (tipo de rotor 70.1 Ti).

Posteriormente se recolectaron fracciones de 500 µl del gradiente utilizando un sistema de bomba peristáltica CTP 100 (Thermo Fisher Scientific), a un caudal de 1 ml/minuto, y un colector de fracciones FRAC 100 (Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se llevó a cabo la purificación de RNA de cada una de las fracciones siguiendo el protocolo antes mencionado.

### 3.13 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó a partir de las fracciones recolectadas del aislamiento de partículas virales en el servicio de microscopía del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Para ello se aplicó la técnica de descarga luminiscente (30 segundos, 7,2 voltios, usando un sistema de revestimiento Bal-Tec MED 020) sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono, sobre las que inmediatamente después se colocaron 10  $\mu$ l de muestra durante 10 minutos. Después de dos breves lavados en agua destilada, se contrastaron con acetato de uranilo al 1% durante 5 minutos.

Se eliminó el exceso de líquido y se dejó secar antes de examinarlo con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Spirit (Thermo Fisher Scientific, Oregón, EE. UU).

Todas las imágenes se adquirieron utilizando el *software* Radius con una cámara digital Xarosa (EMSIS GmbH, Münster, Alemania). Finalmente, las microfotografías se obtuvieron bajo un microscopio electrónico de transmisión (FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin).





# 4. Resultados y discusión



## **4.1 Búsqueda de virosis emergentes de vid en España**

### **4.1.1 Análisis del viroma de la vid mediante HTS**

El análisis bioinformático del viroma de siete muestras de vid procedentes de tres denominaciones de origen españolas (D.O. Utiel-Requena, D.O. Priorato y D.O. Valencia) y tres variedades diferentes (Bobal, Tempranillo y Crimson Seedless), recolectadas en diferentes años (2017, 2018, 2019 y 2020) se resume en la tabla 4. Los ensamblados realizados con el *software* CLC a partir de los *reads* de cada muestra (véase 3.4.2) proporcionó un número de *contigs de novo* que osciló entre 1.459 y 19.543. El análisis de los *contigs* mediante BLASTN/X contra las diferentes bases de datos utilizadas en este estudio reveló la presencia de infecciones mixtas con virus comunes y emergentes, así como presencia de dos especies de viroides (Tabla 4).

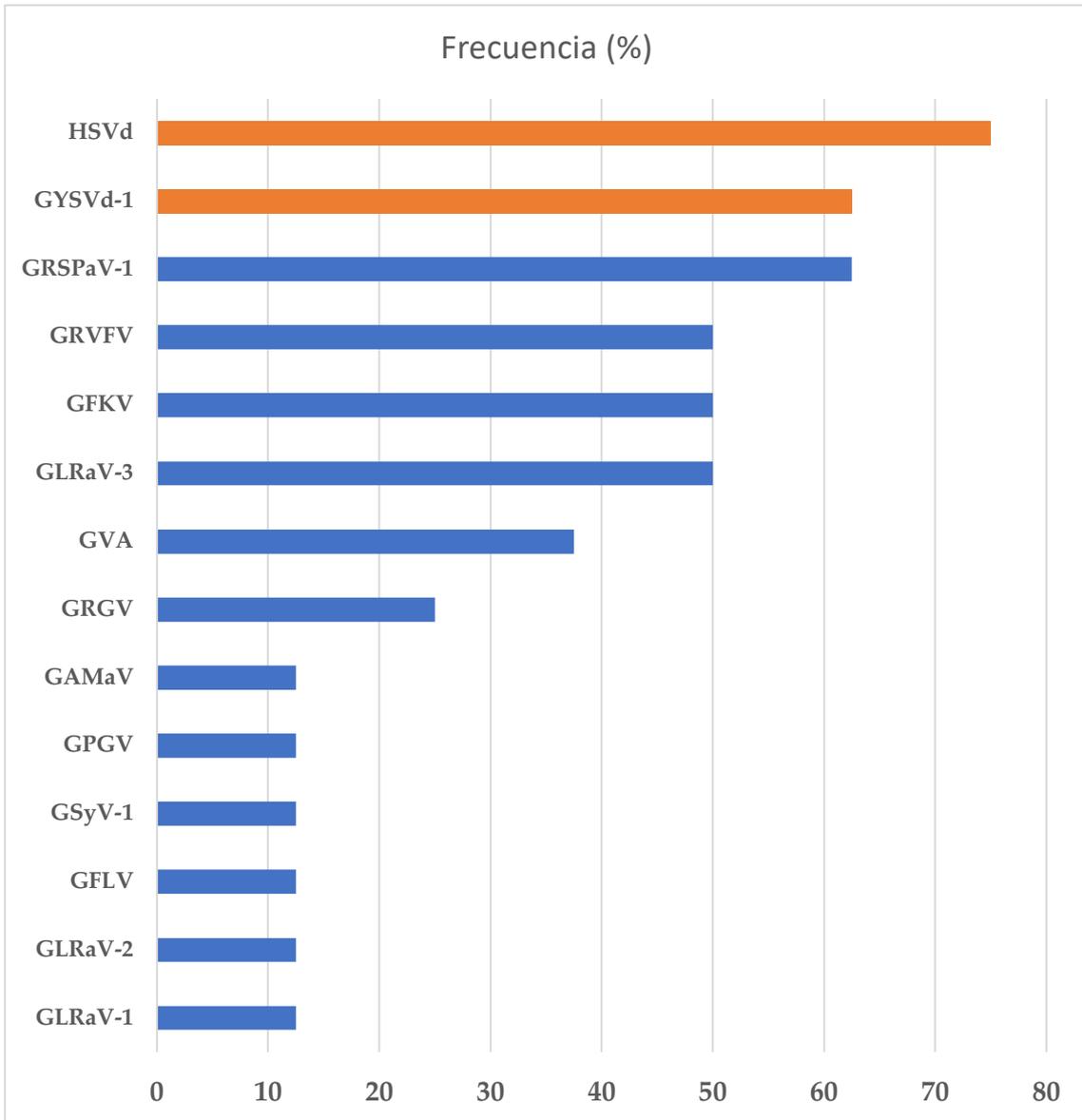
Los virus encontrados con mayor frecuencia mediante HTS correspondieron a las especies GRSPaV-1 y GVA, estando presentes en el 62,5% y el 37,5% de las muestras analizadas, respectivamente. GLRaV-3, GFkV y GRVfV estaban presentes en la mitad de las muestras (50%). Los virus menos frecuentes (<25%) correspondieron por una parte a las especies comunes GLRaV-1, GLRaV-2, GFLV y GSyV-1, y por otra parte se detectaron dos virus emergentes, GPGV y GAMaV. Respecto a los viroides las especies detectadas correspondieron a hop stunt viroid (HSVd) y grapevine yellow speckle viroid-1 (GYSVd-1), estando presentes en un 75% y un 62,5% de las muestras, respectivamente (Figura 21).

**Tabla 4** Resultados obtenidos mediante secuenciación masiva (HTS) de las muestras de vid analizadas y especies de virus y viroides detectados mediante el análisis bioinformático de los datos.

Muestra	Año	Variedad	Denominación de Origen	Número de reads <sup>1</sup>	Contigs de novo	Virus y viroides de vid detectados <sup>2</sup>
19.5	2017	Bobal	Utiel-Requena	827.368	1.047	GLRaV-1; GLRaV-3; GVA; GFkV
R117	2017	Bobal	Priorato	996.286	1.459	GPGV; GFLV; GRSPaV-1; GSyV-1; HSVd; GYSVd-1
Pin1	2018	Crimson Seedless	Valencia	8.642.008	14.375	GRSPaV-1; GLRaV-3; GVA; GFkV; GRGV; GRVfV; GYSVd-1; HSVd
49.3	2018	Crimson Seedless	Valencia	853.265	19.543	GRSPaV-1; HSVd
R5	2019	Tempranillo	Utiel-Requena	2.702.189	2.696	GLRaV-3; GRVfV; GRSPaV-1; GVA; GRGV; GYSVd-1; HSVd
R35	2020	Bobal	Valencia	3.735.091	5.852	GLRaV-3; GRVfV; GFkV; GYSVd-1; HSVd
TS1	2020	Tempranillo	Utiel-Requena	2.410.654	13.303	GRVfV; GFkV; GRSPaV-1; GVA; GLRaV-2; GAMaV; GYSVd-1; HSVd

<sup>1</sup> Número de *reads* obtenidas después de la sustracción del genoma de la vid. <sup>2</sup> grapevine fanleaf virus (GFLV); grapevine fleck virus (GFkV); grapevine leafroll associated virus 1 (GLRaV-1); grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV-2); grapevine Pinot gris virus (GPGV); grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3); grapevine Red Globe virus (GRGV); grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV); grapevine Syrah virus 1 (GSyV-1); grapevine virus A (GVA); grapevine rupestris stem pitting-associated virus 1 (GRSPaV-1); grapevine asteroid mosaic associated virus (GAMaV); grapevine yellow speckle viroid-1 (GYSVd-1); hop stunt viroid (HSVd).





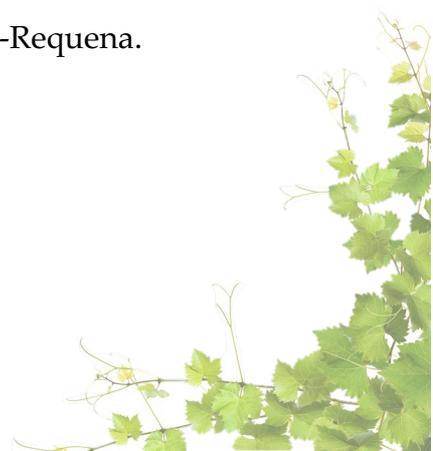
**Figura 21** Frecuencia de los virus y viroides detectados en las muestras analizadas mediante técnicas de secuenciación masiva o HTS. Las barras de color azul representan las especies virales y los de color naranja los viroides detectados.

Grapevine fanleaf virus (GFLV); grapevine fleck virus (GfKV); grapevine leafroll associated virus 1 (GLRaV-1); grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV-2); grapevine Pinot gris virus (GPGV); grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3); grapevine Red Globe virus (GRGV); grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV); grapevine Syrah virus 1 (GSyV-1); grapevine virus A (GVA); grapevine rupestris stem pitting-associated virus 1 (GRSPaV-1); grapevine asteroid mosaic associated virus (GAMaV); grapevine yellow speckle viroid-1 (GYSVd-1); hop stunt viroid (HSVd).

Adicionalmente a la búsqueda mediante BLASTN/X, se realizó otra búsqueda más exhaustiva sobre los datos de HTS dirigida a los principales virus emergentes de la vid (GVT, GVE, GVF, GRBV, GRLDaV y GVCV) mediante el algoritmo de mapeo *Geneious Read Mapper Algorithm* contra secuencias de referencias de estas especies virales (anexo 8.2). Para ello se emplearon dos estrategias diferentes, la primera haciendo uso de las *reads* una vez realizada la sustracción genómica de *V. vinifera* L. y la segunda utilizando *reads* sin la eliminación de genoma de vid, con la finalidad de evitar la pérdida de posibles *reads* útiles para el alineamiento que pudieran haberse perdido durante el cribado bioinformático. Los resultados de los análisis de mapeo de las muestras de vid españolas analizadas mediante HTS dirigidos a la detección de virus emergentes revelaron la ausencia de secuencias genéticas relacionadas con los virus emergentes GVT, GVE, GVF, GRBV, GRLDaV y GVCV.

#### **4.1.2 Evaluación del estado sanitario en viñedos amparados bajo D.O.**

Durante el periodo comprendido entre los años 2017 y 2020 se evaluó la presencia de seis de los principales virus emergentes de la vid (GVT, GVE, GVF, GRBV, GRLDaV, GVCV, GAMaV y GPGV) en 820 muestras de 9 variedades diferentes (Tempranillo; Garnacha; Syrah; Bobal; Macabeo; Cabernet Sauvignon; Aledo, Ideal y Crimson Seedless) y cinco denominaciones de origen (D.O. Manchuela, D.O. Priorato; D.O. Utiel Requena; D.O. Vinalopó y D.O. Valencia) (Tabla 5). Los resultados de la detección de estos ocho virus, realizada mediante métodos de PCR y RT-PCR específicos, mostraron la ausencia de los virus emergentes GVE, GVF, GVT, GRLDaV, GVCV y GRBV en todas las prospecciones realizadas en las cinco denominaciones de origen analizadas durante 4 años. Sin embargo, sí se detectó la presencia de los virus GAMaV y GPGV en la D.O. Utiel-Requena.



## Resultados y discusión

En el caso de GPGV este fue detectado en las prospecciones realizadas en los años 2017 y 2019 con prevalencias del 12,3% y 5,8% respectivamente. En el caso del virus GAMaV, este solo se detectó en la prospección realizada en el año 2019, con una prevalencia del 19,2%. La prevalencia total de GPGV y GAMaV considerando el total de muestras analizadas durante 4 años fue del 1,2% y 3,9%.

**Tabla 5.** Resultados del análisis de la presencia de ocho de los principales virus emergentes de la vid (GVT, GVE, GVF, GRBV, GRLDaV y GPGV) realizadas mediante PCR y RT-PCR de 820 muestras de nueve variedades de vid de cinco D.O.

Nº. Muestras	Variedades	D.O.	Años	GVE <sup>1</sup>	GVF <sup>1</sup>	GVT <sup>2</sup>	GRBV <sup>3</sup>	GRLDaV <sup>4</sup>	GAMaV <sup>4</sup>	GPGV <sup>4</sup>	GVCV <sup>5</sup>
50	Tempranillo	Manchuela	2017	-	-	-	-	-	-	-	-
80	Garnacha y Syrah	Priorato	2017	-	-	-	-	-	-	-	-
178	Bobal; Macabeo	Utiel-Requena	2017	-	-	-	-	-	-	22 (12,3%)	-
5	Crimson Seedless	Valencia*	2018	-	-	-	-	-	-	-	-
52	Tempranillo; Macabeo	Utiel-Requena	2019	-	-	-	-	-	10 (19,2%)	3 (5,8%)	-
128	Aledo; Ideal	Vinalopó*	2019	-	-	-	-	-	-	-	-
86	Bobal, Tempranillo, Cabernet Sauvignon y Syrah	Utiel-Requena	2020	-	-	-	-	-	-	7 (8,1%)	-
241	Bobal; Chardonnay	Valencia	2020	-	-	-	-	-	-	-	-
820	9 variedades	5 orígenes	4 años	-	-	-	-	-	10 (1,2%)	32 (3,9%)	-

\* Vinalopó: Uva de Mesa Embolsada del Vinalopó; <sup>1</sup> Grapevine virus F y grapevine virus E detectados mediante RT PCR convencional de acuerdo a Panailidou *et al.*, (2019); <sup>2</sup> grapevine virus T detectado mediante RT PCR convencional de acuerdo a Glasa *et al.*, (2018); <sup>3</sup> grapevine red blotch virus mediante PCR de acuerdo Poojari *et al.*, (2013); <sup>4</sup> grapevine Roditis leaf-discoloration associated-virus, grapevine asteroid mosaic associated virus y grapevine Pinot gris virus detectados de acuerdo a los protocolos de detección descritos en el apartado 3.10; <sup>5</sup> grapevine vein clearing virus detectado mediante PCR convencional de acuerdo a Zhang *et al* (2011).

### 4.1.3 Discusión

La evaluación mediante técnicas de HTS sobre el estado sanitario de las diferentes variedades de vid y D.O. muestran la presencia de hasta trece especies diferentes de virus y viroides en los cultivos españoles estudiados. De las diferentes especies detectadas, se pudo apreciar la existencia de virus y viroides clásicos de la vid, tales como GRSPaV-1, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GFLV, GFkV, GRVfV, HSVd y GYSVd-1.

Estos resultados muestran que virus como GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GFkV, GFLV y GRSPaV-1 a día de hoy, siguen teniendo una presencia destacada en la viticultura española, corroborando así lo descrito por Barrios Sanrona *et al.*, en el año 2004. Ocurre algo similar respecto a la alta prevalencia del virus GRSPaV-1 detectada en este estudio (62,5%), la cual corrobora los datos obtenidos en otro estudio realizado en cultivos de la Comunidad Valenciana en el año 2011 (Fiore *et al.*, 2016), donde describen una alta y destacada prevalencia de este mismo virus. Posiblemente esta alta prevalencia sea debida a la fácil dispersión que tiene este virus mediante injerto (Martelli, 1993), a su posible dispersión a través del polen y semilla (EPPO, 2008; Gasparro *et al.*, 2016) y al trasiego de material vegetal infectado con este virus.

En el estudio realizado por Fiore *et al.* (2006), también detectaron una alta prevalencia del 92% para el viroide HSVd, y bajas prevalencia para el viroide GYSVd-1 (6%) y el virus GVA (3.1%); estos resultados son diferentes a los obtenidos en este estudio, donde la prevalencia de ambos viroides y del virus han sido del 75%, para HSVd, del 62,5% para GYSVd-1 y del 37,5% para GVA. Esto podría indicar que ha habido un incremento de la prevalencia del viroide GYSVd-1 y el virus GVA a lo largo de los años, mientras que la presencia de HSVd continua siendo relativamente alta, encontrándose de forma latente en los cultivos españoles. Sin embargo, se requieren estudios de mayor profundidad para confirmar esta hipótesis.

Además de estos virus y viroides clásicos, y como uno de los objetivos principales de esta tesis, también se han detectado mediante HTS y RT-PCR la presencia otros virus emergentes con prevalencias relativamente bajas, como ha sido el caso de los virus GPGV y GAMaV.

La presencia de GPGV en los cultivos españoles de vid, según los análisis realizados mediante HTS y RT-PCR en tiempo real, es baja; con una prevalencia de hasta un 12,3% en la D.O. Utiel-Requena. Adicionalmente se ha detectado este virus tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas (véase 4.2.2).

Por lo tanto, este virus emergente, identificado por primera vez en el año 2017 en España (Ruiz-García & Olmos, 2017) y el cual se asocia a importantes síntomas que afectan a la producción de uva (Giampetruzzi *et al.*, 2012), de momento no se encuentra muy disperso en las plantaciones españolas analizadas y tampoco está suponiendo un problema para el sector viticultor de las D.O. analizadas.

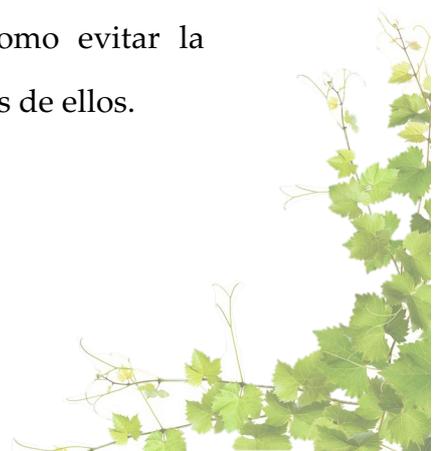
Otro punto interesante es que, en este estudio, todas las muestras en donde se ha detectado este virus tienen un origen único, la D.O. Utiel-Requena, y no ha sido detectado en el resto de D.O. estudiadas. Sin embargo, este virus ya había sido descrito previamente infectando dos muestras de vid de la variedad Tempranillo en la D.O. Manchuela (Ruiz-García & Olmos, 2017). Todo esto podría indicar que GPGV se encuentra localizado de momento con una baja prevalencia solo en las regiones de las D.O Utiel-Requena y D.O Manchuela y no ha llegado a dispersarse por otras regiones del levante español. Considerando que GPGV es capaz de transmitirse rápidamente dentro de los monocultivos de vid (Bertazzon *et al.*, 2020), que existe una baja prevalencia de este virus en las D.O. españolas estudiadas, y que se ha detectado en plantas de vid de variedades locales tanto sintomáticas como asintomáticas, todo ello podría sugerir que los cultivos de las variedades locales españolas analizadas son menos susceptibles a padecer infecciones por GPGV.

La baja prevalencia del virus podría también estar relacionada con una baja eficiencia en la transmisión por parte del posible vector *C. vitis* (Malagnini *et al.*, 2016), el cual se encuentra de manera recurrente en los cultivos de vid españoles (Gallardo *et al.*, 2004) y para el que no se ha demostrado que sea capaz de transmitir el virus en condiciones naturales.

El virus emergente GAMaV ha sido identificado por primera vez en España en este estudio (Morán *et al.*, 2021). De igual manera, la presencia de GAMaV en los cultivos españoles de vid analizados es también baja, detectándose con una prevalencia de tan solo el 1,2% de las muestras analizadas. De hecho, este marafivirus, que se asocia al complejo de enfermedades del jaspeado o *fleck*, (Martelli, 2014, 2017; Vargas-Asencio *et al.*, 2017), ha sido detectado únicamente en la D.O. Utiel-Requena.

GAMaV también ha sido detectado tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas (véase 4.2) y, según los análisis realizados en este estudio, tampoco se ha visto asociado la presencia de este virus a una problemática en los viñedos españoles.

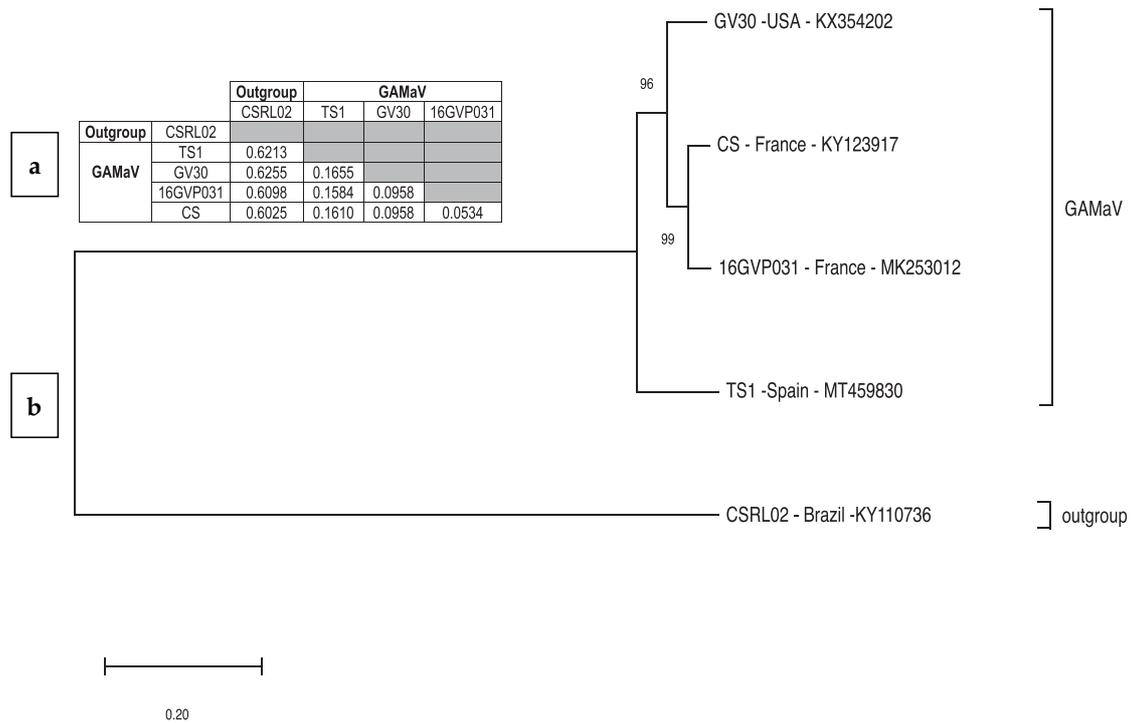
La presencia de los virus emergentes GPGV y GAMaV, entre otros virus, en la región de la D.O. Utiel-Requena indica por tanto la necesidad de abordar estrategias de control eficaz para evitar la dispersión de estos patógenos por la posible problemática que pudieran causar en un futuro. Aunque no se han detectado sintomatologías claramente asociadas a estos virus, no se puede descartar su peligrosidad, ya que de acuerdo con la bibliografía se asocian a importantes enfermedades, que pueden suponer un problema para el sector viticultor español, por lo que su presencia no debe ser ignorada. En este sentido, se deben de tomar medidas de control preventivo, para evitar la dispersión de estos dos virus tanto en las regiones donde esté presente como evitar la introducción en otras zonas viticultoras de España que estén libres de ellos.



## 4.2 Grapevine asteroid mosaic virus

### 4.2.1 Caracterización molecular de GAMaV

Una de las muestras de la variedad Tempranillo (TS1), prospectada en el año 2019 en la D.O. Utiel-Requena presentaba síntomas de moteado clorótico y deformaciones foliares. El análisis realizado a esta muestra mediante secuenciación masiva (ver el apartado 4.1.1) reveló la presencia del virus GAMaV. En el análisis por HTS se detectaron cuatro *contigs* de diferentes tamaños (2.736 nt, 1.448 nt, 1.285 nt y 954 nt) relacionados con el virus GAMaV. La extensión de estos *contigs*, mapeando los *reads* contra los *contigs* mediante el algoritmo de mapeo *Geneious Read Mapper Algorithm* implementado en Geneious prime 2020 (Biomatters Ltd., Auckland, Nueva Zelanda) (véase 3.4.2), permitió la recuperación de la secuencia genómica completa de GAMaV, exceptuando una región de 147 nt en el dominio de la helicasa de la poliproteína. El número total de *reads* mapeadas fue de 635, con una cobertura promedio por nucleótido de 10. Esta parte de la secuencia genómica, no recuperada por HTS, fue obtenida mediante RT-PCR y secuenciación Sanger, utilizando cebadores flanqueantes que se diseñaron en base a la secuencia recuperada por HTS, GAMaV3755-F (5'-ATC CTC ACC AAC TCC C-3' y GAMaV-3985-R (5'-GTT GGA AGT GGT GTG-3'). La secuencia genómica del aislado GAMaV TS1 (MT459830) de 6.692 nt mostró 87,7% de identidad de nucleótidos con el aislado 16GVP031 (MK253012) originario de Francia. Sin embargo, la poliproteína del aislado TS1 tiene cuatro aminoácidos menos que el aislado francés, debido a la presencia de una serie de inserciones y deleciones en el extremo 5' de la ORF de la poliproteína, en concreto una deleción de 9 nt, dos deleciones de 3 nt, una deleción de 2 nt, una inserción de 3 nt y dos inserciones de 1 nt. El análisis filogenético realizado con los otros tres genomas completos de GAMaV disponibles en las bases de datos mostraron que el aislado español está posicionado en un clado o agrupación diferente, tratándose por tanto de un aislado divergente (Figura 22).



**Figura 22. a.** Estimaciones de divergencia evolutiva entre las secuencias genómicas completas disponibles de GAMaV. Se muestra el número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre secuencias; **b.** Árbol filogenético construido con todos los genomas completos de diferentes aislados de GAMaV mediante el método máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) y utilizando el mejor modelo de sustitución Tamura-Nei. La prueba de *bootstrap* se realizó con 500 réplicas y se muestran valores mayores a 75. Se empleó como *outgroup* el aislado CSRL02 de la especie *Citrus sudden death-associated virus*. Los distintos aislados GAMaV y *outgroup* se identifican por su número de acceso y su origen.

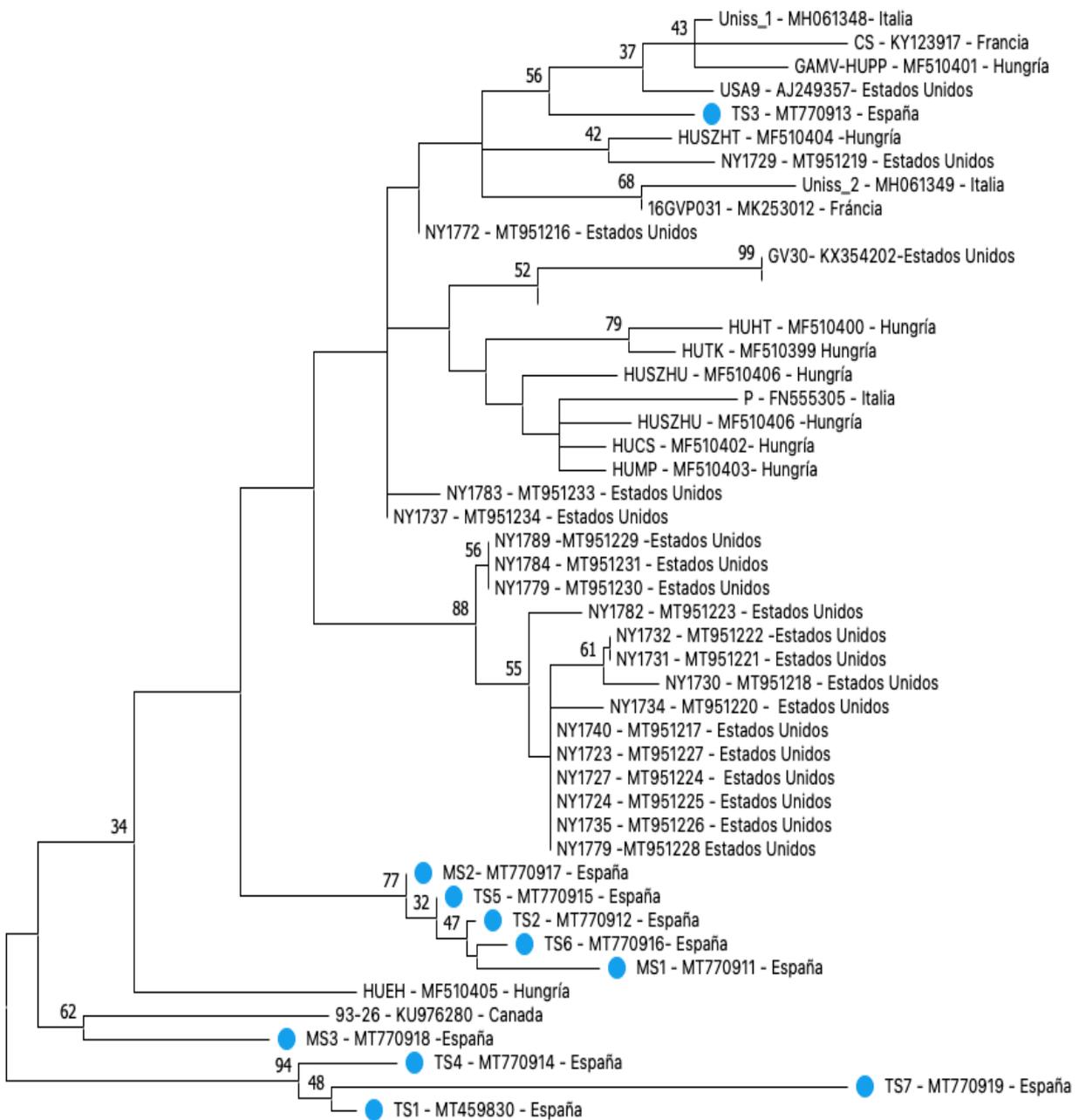
Con la finalidad de estudiar la diversidad genética del virus GAMaV detectado en la D.O. Utiel Requena, se secuenció una región parcial de 417 nt del gen de la proteína de la cápsida (CP) con los cebadores GAMaV6010F y GAMaV-6426R, a partir de las diez muestras positivas para GAMaV (véase 4.1.2). La secuenciación Sanger obtenida a partir de los productos amplificados mediante RT-PCR confirmó la secuencia del aislado TS1 recuperado por HTS y además confirmó la presencia del marafivirus en las ocho muestras restantes, con un total de nueve positivos.



## Resultados y discusión

De las diez muestras positivas, solo los aislados de la variedad Tempranillo, TS1 y TS7 (MT770919,) presentaban síntomas similares a los descritos para GAMaV; mientras que las ocho muestras restantes, MS1, MS2 y MS3 (MT770911, MT770917 y MT770918) y TS2, TS3, TS4, TS5 y TS6 (MT770912, MT770913, MT770914, MT770915, MT770916), de las variedades Tempranillo y Macabeo, eran asintomáticas. La identidad de nucleótidos entre todas estas secuencias parciales y la región homóloga del aislado GAMaV TS1, estimada con el *software* Geneious prime 2020 (Biomatters Ltd., Auckland, Nueva Zelanda), osciló entre el 94,7% y el 98,8%, siendo 0,04 la media de diversidad entre los aislados para la región genómica CP estudiada.

El análisis filogenético, realizado con 47 secuencias parciales del gen de la CP de aislados GAMaV de diferentes orígenes, mostró la existencia de divergencias entre los aislados detectados en España, puesto que no se observó una agrupación única para todos ellos. De hecho, los aislados españoles (MS1, MS2, MS3, TS1, TS2, TS3, TS4, TS5, TS6 y TS7) constituyen cuatro agrupaciones o clados diferentes (Figura 23). Específicamente, el aislado TS3 se posicionó en un clado que incluye aislados de origen geográfico muy diverso, originarios de Hungría, Estados Unidos, Francia e Italia; el aislado MS3 se situó en el clado que contiene el aislado 93-26 descrito en Canadá; los aislados españoles TS1, TS2, TS4, TS5, TS6, TS7, MS1 y MS2 agruparon en dos clados independientes al resto de aislados ya descritos, conteniendo solo aislados GAMaV españoles.

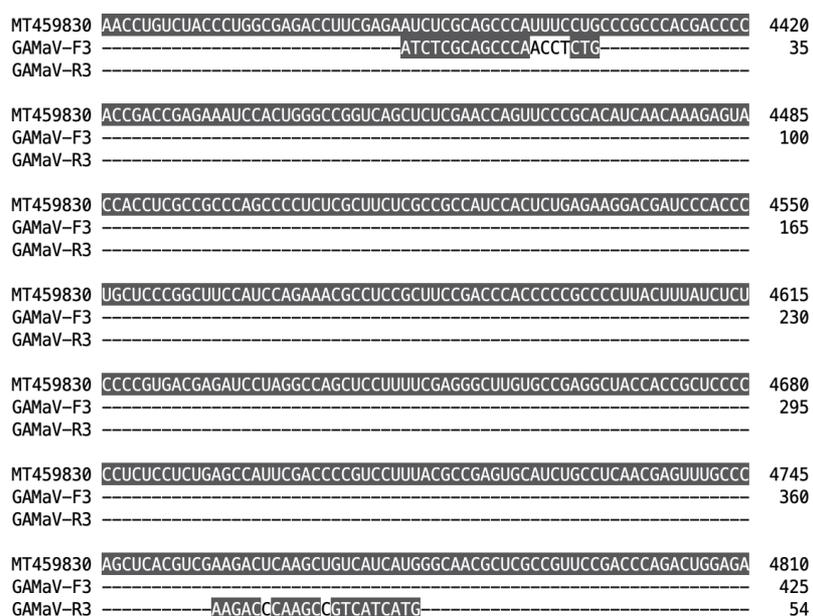


**Figura 23.** Análisis filogenético de 47 aislados del virus GAMaV, utilizando secuencias parciales (417 nt) del gen de la proteína de la cápsida (CP), por el método máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*). El árbol se realizó utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos Hasegawa-Kishino-Yano. El análisis de *bootstrap* se realizó con 1000 réplicas. En azul se señalan los aislados españoles.



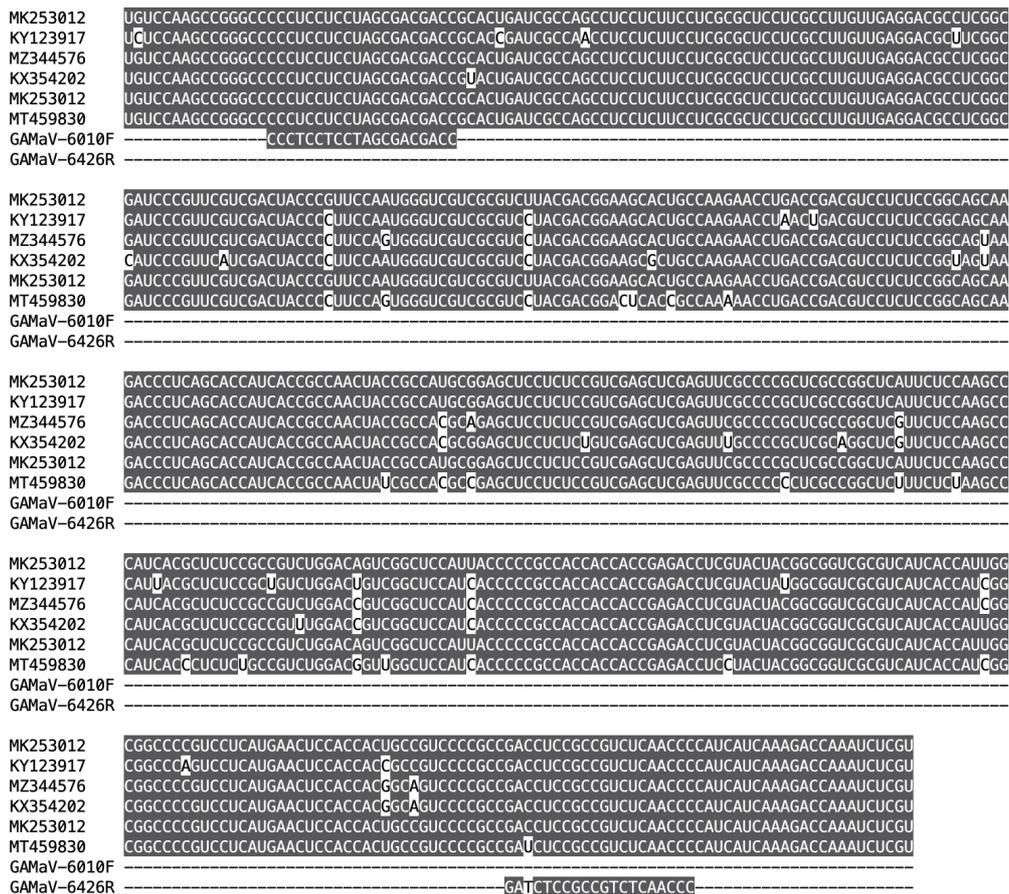
#### 4.2.2 Desarrollo de un método de detección específico para GAMaV

Como ya se ha mencionado en el apartado 4.2.1, el aislado TS1 descrito en este estudio mostró una similitud del 87,7% con el aislado GAMaV 16GVP031 originario de Francia. Por lo tanto, se analizaron las 52 muestras de la prospección realizada en 2019 en la D.O. Utiel-Requena mediante RT-PCR utilizando los cebadores específicos GAMaV-F3 (5'-ATC TCG CAG CCC AAC CTC TG-3') y GAMaV-R3 (5'-CAT GAT GAC GGC TTG GGT CTT-3') descritos por Candresse *et al.*, (2017) para la detección del aislado francés 16GVP031. Los resultados de los análisis mediante RT-PCR con estos cebadores fueron negativos en todas las muestras, incluyendo la muestra TS1, en la cual se había identificado mediante HTS este virus. Un análisis *in silico* realizado con el *software* Geneious prime 2020 (Biomatters Ltd., Auckland, Nueva Zelanda) alineando las secuencias de los cebadores descritos por Candresse *et al.*, (2017) (GAMaV-F3 y GAMaV-R3) con la secuencia recuperada del aislado TS1 (MT459830) mostró la existencia de mutaciones en el aislado español que no permitían una correcta unión de los cebadores (Figura 24).



**Figura 24.** Alineamiento de secuencias correspondientes a los cebadores específicos descritos previamente por Candresse *et al.*, (2017) (GAMaV-F3 y GAMaV-R3) con la secuencia del aislado español GAMaV TS1 (MT459830). Los nucleótidos señalados en blanco representan las mutaciones y en gris las concordancias.

Dado que con los cebadores específicos descritos previamente para la detección del aislado 16GVP031 no se pudo detectar el aislado español TS1, se procedió a realizar un alineamiento con el *software* MEGA X de los únicos cinco genomas disponibles del GAMaV, procedentes de USA, Francia, Canadá y España, correspondientes a los aislados GV30 (KX354202), CS (KY123917), 16GVP031 (MK253012), 14G480 (MZ344576) y TS1 (MT459830). A partir de este alineamiento se diseñaron dos nuevos cebadores en una región conservada del gen de la proteína de la cápsida (CP), GAMaV-6010F (5'-CCC TCC TCC TAG CGA CGA CC-3') y GAMaV-6426R (5'-GGG TTG AGA CGG CGG AGA TC-3') amplificando un fragmento de 417 nt (Figura 25).



**Figura 25.** Alineamiento de secuencias correspondientes a los cebadores específicos descritos diseñados en este estudio (GAMaV6010F, y GAMaV-6426R) con cinco genomas de diferentes orígenes (USA, Francia, Canadá y España) correspondientes a los aislados GV30 (KX354202), CS (KY123917), 16GVP031 (MK253012), 14G480 (MZ344576) y TS1 (MT459830). Los nucleótidos señalados en blanco representan las mutaciones y en gris las concordancias.

El análisis mediante la RT-PCR descrita en el presente estudio (ver apartada 4.1.2) de las 820 muestras de once variedades de vid de cinco D.O. españolas mostró que existe una baja prevalencia de este virus (1,2%), que solo se detectó en la D.O. Utiel-Requena en el año 2019 en las variedades Tempranillo y Macabeo. Análisis realizados sobre muestras de la misma D.O. realizados en años anteriores y posteriores al 2019 no detectaron la presencia de este virus.

### 4.2.3 Discusión

El análisis de la secuenciación de RNA total mediante HTS realizado sobre la muestra TS1 ha permitido el ensamblado de un genoma casi completo del primer aislado del virus GAMaV detectado en España (TS1- MT459830). Este nuevo aislado presenta una peculiaridad respecto al resto de aislados descritos hasta el momento (GV30, CS, 16GVP031, 14G480), y es que presenta una poliproteína más pequeña, de 2155 aminoácidos. Los polimorfismos (deleciones e inserciones) que hacen más corta la poliproteína de este nuevo aislado no se encuentran localizados en ninguna región de los dominios conservados de los marafivirus, por lo que probablemente no comprometen la infectividad del virus. Los estudios filogenéticos basados en genomas completos demostraron que el aislado TS1 difiere del resto de los aislados franceses y americanos descritos hasta ahora. Adicionalmente, el análisis de secuencias parciales de la región de la CP avaló esta divergencia entre los aislados españoles y el resto de aislados procedentes de Hungría, Estados Unidos, Francia e Italia, con la excepción de los aislados TS3 y MS3, que se asemejan a otros aislados ya descritos. Todo ello sugiere que la presencia de este virus en España no es reciente, dado que la presión evolutiva ha propiciado una acumulación de mutaciones puntuales en su información genética, que ha resultado en la diversificación de un aislado local diferente a los ya descritos (Dolja *et al.*, 2017).

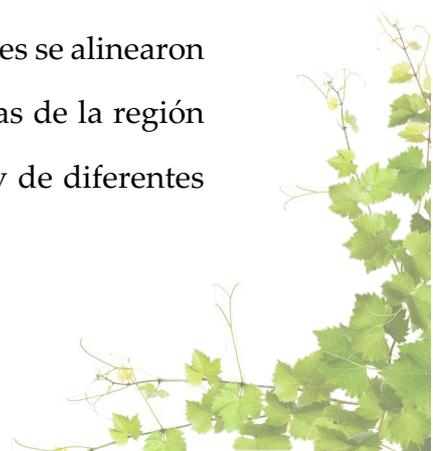
Por otro lado, el conocimiento del genoma completo del aislado TS1, permitió el diseño de nuevos cebadores específicos con mayor inclusividad, capaces de detectar los aislados GAMaV españoles, a diferencia de otros cebadores previamente descritos (Candresse *et al.*, 2017). Los análisis mediante RT-PCR de muestras de vid en cultivos españoles demostró que GAMaV se encontraba tanto en plantas sintomáticas (con moteado clorótico y deformaciones foliares) como en plantas asintomáticas, siendo incluso mayoritario el número de plantas asintomáticas. Así pues, en el caso de los aislados españoles, no queda claro si pueden estar asociados o no a una sintomatología o enfermedad. El desarrollo de un clon infeccioso basado en la secuencia del aislado TS1 puede abrir una línea de investigación que permita dilucidar esta cuestión.

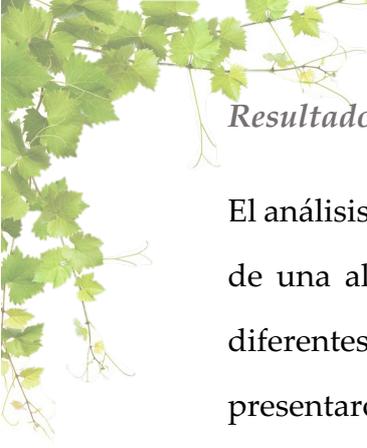
### **4.3 Grapevine Pinot gris virus**

#### **4.3.1 Caracterización molecular de GPGV**

La caracterización molecular y el estudio filogenético de los aislados de GPGV españoles se basó en la comparación de las secuencias parciales de un fragmento de 588 nt en la región MP/CP de doce aislados de GPGV españoles: RQ25, RQ30, RQ99, RQ106, RQ108, RQ111, RQ113, RQ115, RQ116, RQ117, RQ125 y RQ136 (MH019203, MH019204, MH019205, MH019206, MH019207, MH019208, MH019209, MH019210, MH019211, MH019212, MH019213 y MH019214, respectivamente). La amplificación y secuenciación se llevó a cabo utilizando los cebadores Det-F y Det-R descritos por Morelli *et al.*, (2014).

El análisis mediante BLASTN de las secuencias mostró que los aislados RQ99, RQ106, RQ108, RQ111, RQ113, RQ115, RQ116, RQ117, RQ125 y RQ136 presentaban porcentajes de identidad mayores del 98% con otros aislados originarios de Italia, Francia y Canadá. Las doce secuencias parciales se alinearon empleando el *software* MEGA X, incluyéndose otras 224 secuencias de la región MP/CP de diferentes aislados de GPGV con diferentes orígenes y de diferentes variedades de vid (anexo 8.2).





## Resultados y discusión

El análisis filogenético se realizó con 236 aislados de GPGV y mostró la existencia de una alta diversidad genética en los aislados españoles, que agruparon en diferentes clados (Figura 26). Los aislados RQ99, RQ106, RQ111, RQ113 y RQ116 presentaron proximidad filogenética al aislado italiano SRR1631863-67-68 de la variedad Primitivo-Refosco. El aislado RQ 108 agrupó en un clado que contiene aislados de República Checa y China (22\_2\_3 y SRR8260950) de las variedades Chardonnay y Victoria, respectivamente.

Por último, los aislados RQ30 y RQ25 agruparon en un clado bastante lejano al resto de los aislados españoles, mostrando relaciones filogenéticas con aislados franceses IV6-I69-4-2; IV6-I73-2-3; IV5-I76-I e IV7-I78-2 correspondiente a los portainjertos 3309 Couderc 0144, 3309 Couderc 0143, Riparia Gloria de Montpellier y 41B MGT, respectivamente.

Adicionalmente, en las secuencias de los aislados RQ25 y RQ30 (MH019203 y MH019204) se detectó un nuevo polimorfismo no descrito hasta ahora. Este polimorfismo se sitúa en la región codificante solapante de la proteína de movimiento con la proteína de la cápsida (MP/CP). Este nuevo polimorfismo es de un único nucleótido o *single nucleotide polymorphism*, (SNP) y se localiza en la región codificante de la proteína MP. Este SNP consiste en el cambio de un nucleótido C por un nucleótido U en la posición 6.684 respecto al genoma de referencia de GPGV (NC\_015782.1) y conlleva la presencia de una señal de parada traduccional, un codón de parada aguas abajo respecto al SNP reportado por Saldarelli *et al.*, (2015), que determina la síntesis de una MP cinco aminoácidos más corta. El nuevo SNP detectado en este estudio no fue detectado en ninguna de las 234 secuencias restantes utilizadas en el análisis filogenético.



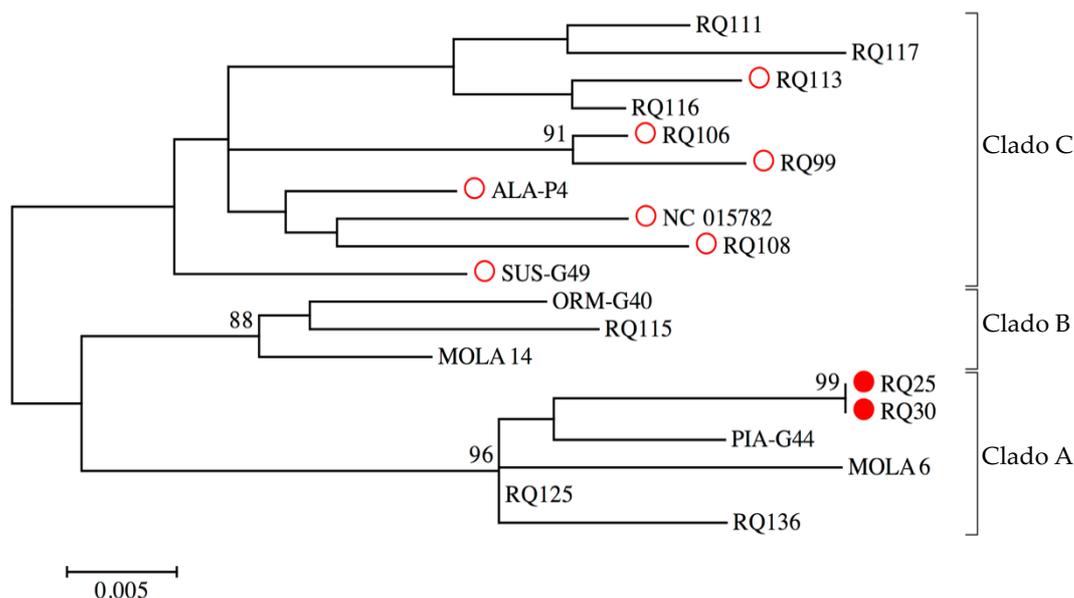
## Resultados y discusión

Dado que (i) las muestras RQ25 y RQ30 mostraban síntomas asociados con GPGV; (ii) que el anterior polimorfismo reportado por Saldarelli *et al.*, (2015) se asociaba a la sintomatología causada por GPGV; y (iii) que algunas de las muestras secuenciadas en este estudio incluían plantas sintomáticas y asintomáticas; se procedió a realizar un alineamiento de las doce secuencias obtenidas, incluyendo el genoma de referencia NC\_015782.1. El alineamiento mostró que el nuevo polimorfismo no está presente en otras plantas sintomáticas. Además, en tres de las muestras analizadas (RQ99, RQ106 y RQ113) el polimorfismo descrito previamente por Saldarelli *et al.* (2015), se encontró tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas (Figura 27).

	6674										P1		P2		6690			
	6674					6680					6684		6687					
NC_015782	U	G	A	C	A	G	A	A	G	G	U	A	A	C	A	A	A	A
MH019213 (RQ125)	U	G	A	C	A	G	A	A	G	G	C	A	A	C	A	A	A	A
MH019208 (RQ111)	U	G	A	C	A	G	A	A	G	G	C	A	A	C	A	A	A	A
MH019211 (RQ116)	U	G	A	C	A	G	A	A	G	G	C	A	A	C	A	A	A	A
MH019212 (RQ117)	U	G	A	C	A	G	A	A	G	A	U	A	A	C	A	A	A	A
MH019207 (RQ108)	U	G	A	C	A	G	A	A	G	G	U	A	A	C	A	A	A	A
MH019210 (RQ115)	U	G	A	C	A	G	A	G	G	G	C	A	A	C	A	A	A	A
MH019209 (RQ113)	U	G	A	C	A	G	A	A	G	G	C	A	A	C	A	A	A	A
MH01921 (RQ136)	U	G	A	C	A	G	A	A	G	G	C	A	A	C	A	A	A	A
MH019203 (RQ25)	U	G	A	C	A	G	A	A	G	G	C	A	A	U	A	A	A	A
MH019204 (RQ30)	U	G	A	C	A	G	A	A	G	G	C	A	A	U	A	A	A	A
MH019205 (RQ99)	U	G	A	C	A	G	A	A	A	A	U	A	A	C	A	A	A	A
MH019206 (RQ106)	U	G	A	C	A	G	A	A	A	A	U	A	A	C	A	A	A	A

**Figura 27.** Alineamiento de secuencias de la región MP/CP donde se localizan los polimorfismos de 12 aislados virales de GPGV españoles utilizando como referencia el aislado IT de GPGV (NC\_015782.1). Se indican dos polimorfismos que producen una proteína de movimiento (MP) más corta: P1 (polimorfismo descrito previamente por Saldarelli *et al.*, (2015) en la posición 6684 y P2 (el nuevo polimorfismo identificado en este trabajo) en la posición 6687.

Un nuevo análisis filogenético más específico, en el que se incluyeron 12 aislados españoles que representan los dos polimorfismos detectados y 8 secuencias de referencia representativas de los tres clados (A, B y C) identificados por Saldarelli *et al.*, (2015) y Bertazzon *et al.*, (2017), se realizó a partir del fragmento de 588 nt amplificado con los cebadores Det-F y Det-R de la región MP/CP (Figura 28).



- Nuevo polimorfismo detectado en este estudio
- Polimorfismo reportado por Saldarelli *et al.*, 2015

**Figura 28.** Análisis filogenético de 12 aislados de GPGV españoles y 8 secuencias de referencia representativas de los tres clados (A, B y C) identificados por Saldarelli *et al.*, (2015) basado en 588 nt de la región MP/CP, por el método máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*). El árbol se realizó utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos Tamura 3. El análisis bootstrap se realizó con 2000 réplicas y se muestran valores mayores a 75.

Los aislados españoles no agruparon en ningún clado en particular, sino que se distribuyeron a lo largo de los tres clados ya descritos (A, B y C). Curiosamente, los dos aislados españoles que muestran el nuevo polimorfismo en la región MP/CP (RQ30 y RQ25) agruparon juntos (clado A) pero no agruparon en el clado donde se localizaban los aislados con el polimorfismo previamente descrito por Saldarelli *et al.*, (2015) (clado C).

### **4.3.2 Desarrollo de un método de detección mediante RT-PCR en tiempo real para GPGV**

#### **4.3.2.1 Diseño de cebadores y sonda**

Los cebadores para la detección de GPGV se diseñaron en una región altamente conservada del genoma, donde solapan las ORF de la MP y de la CP (MP/CP) GPGV-RT-F (5'-GTC TAA ATC TGG CTG TGC TGA AAA TAG TGC-3') y GPGV-RT-R (5'-CCT GAG GTC CCT TCA ACT GC-3') amplificando una secuencia de 228 nt. Una sonda TaqMan ZNA, GPGV-genprobe (5'-6-FAM-AGA TCA ACA GTC AGG AGA GAG CTG ATC GC-ZNA4-BHQ1-3') fue diseñada dentro de la secuencia amplificada por los cebadores.

Los cebadores empleados para el control interno fueron, PEP-F1 (5'- GCC TCC TCC TCC AGA TTG CT-3') y PEP-F2 (5'- AGG CTT GCT TGA TTC CAT TAT CTC TTT CG-3'), basados en los diseñados por Borges *et al.* (2014) con modificaciones, amplifican una secuencia de 196 pb. Se diseñó una sonda TaqMan ZNA dentro de esta región genómica, PEP-probe (5'-Cy5- CGA CCC ATA CTT GAA ACA GAG ACT CCG GC-ZNA-BHQ2-3').

#### **4.3.2.2 Detección de GPGV mediante RT-PCR en tiempo real**

Los resultados de la RT-PCR en tiempo real desarrollada fueron positivos en todos los aislados utilizados como controles positivos de GPGV (Tra7, Tra9, Amb1, SK30, SK45, SK704, RQ30 y RQ25) y procedentes de diferentes orígenes geográficos (Grecia, Eslovaquia y España). Los valores de Ct oscilaron entre 24,2 y 30,7. No se detectó señal para ninguna de las tres variedades de vid saneadas utilizadas como controles negativos.

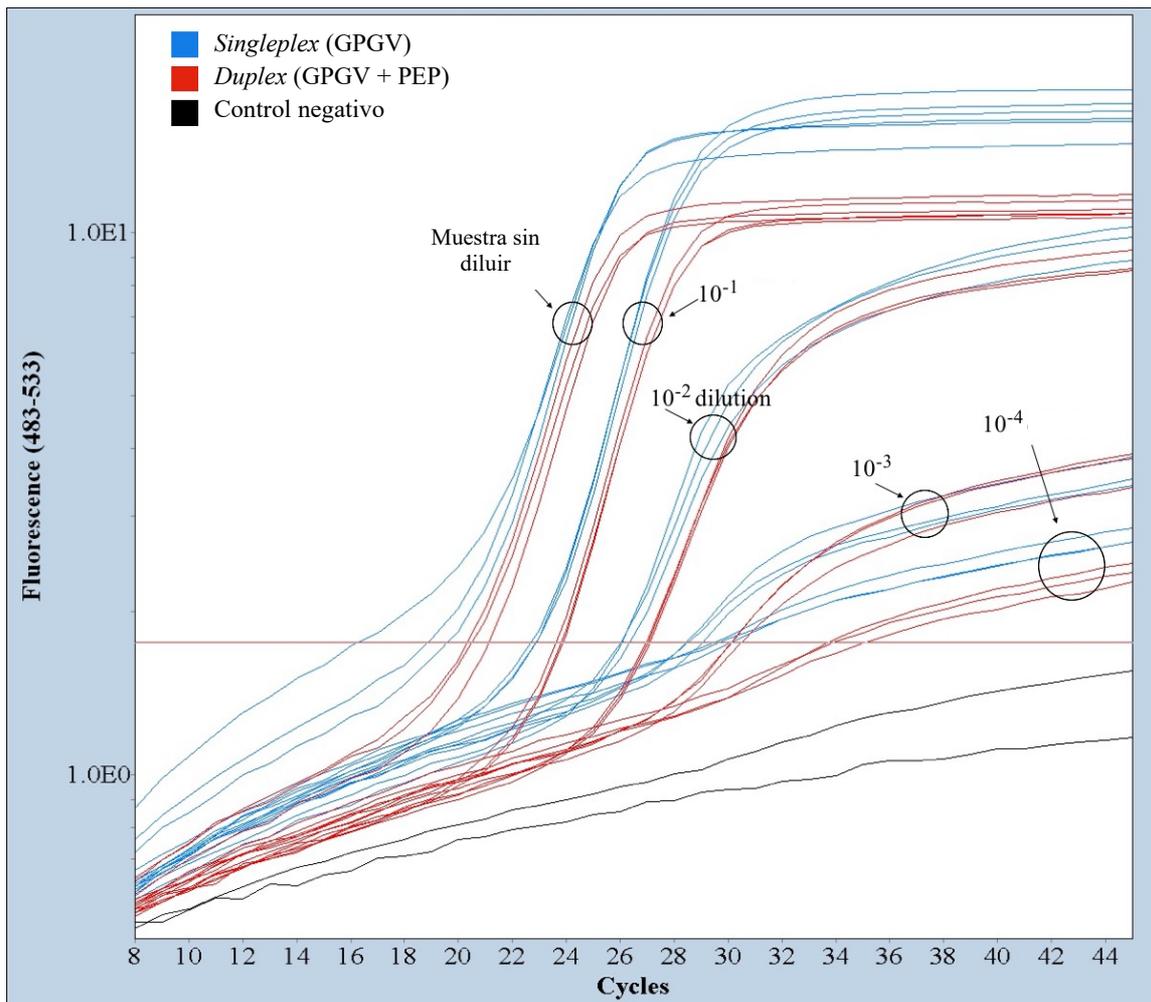
#### 4.3.2.3 Evaluación del efecto del control interno sobre la detección de GPGV

El posible efecto de una reacción de RT-PCR en formato *duplex* sobre la sensibilidad técnica de detección de GPGV se evaluó mediante la comparación de la señal obtenida en un ensayo *singleplex* (utilizando solo cebadores y sonda para GPGV) y la señal obtenida en un ensayo *duplex* (incluyendo los cebadores y la sonda para el control interno de la planta) en diluciones decimales seriadas de extractos de plantas infectadas con GPGV con extractos de plantas sanas (Figura 29).

Cada dilución se ensayó por triplicado. Los promedios de los valores de Ct obtenidos y sus errores estándar fueron para el ensayo *singleplex*: 21,75 ± 0,22 (sin diluir), 24,60 ± 0,11 (dilución 10<sup>-1</sup>), 27,99 ± 0,13 (dilución 10<sup>-2</sup>), 32,22 ± 1,44 (dilución 10<sup>-3</sup>) y 37,68 ± 0,43 (dilución 10<sup>-4</sup>). Los valores de Ct y sus errores estándar para el ensayo *duplex* fueron: 22,54 ± 0,16 (sin diluir), 25,112 ± 0,06 (dilución 10<sup>-1</sup>), 28,80 ± 0,04 (dilución 10<sup>-2</sup>), 31,24 ± 1,31 (dilución 10<sup>-3</sup>) y 36,79 ± 1,03 (dilución 10<sup>-4</sup>).

Se realizó el test T de Student comparando los valores de Ct obtenidos en las dos condiciones (*duplex* y *singleplex*), para ver si existían diferencias significativas entre ellas. No se encontraron diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95%, lo que indica que el control interno no compromete la capacidad del método para detectar con éxito la presencia del virus ni disminuye la sensibilidad de la detección.





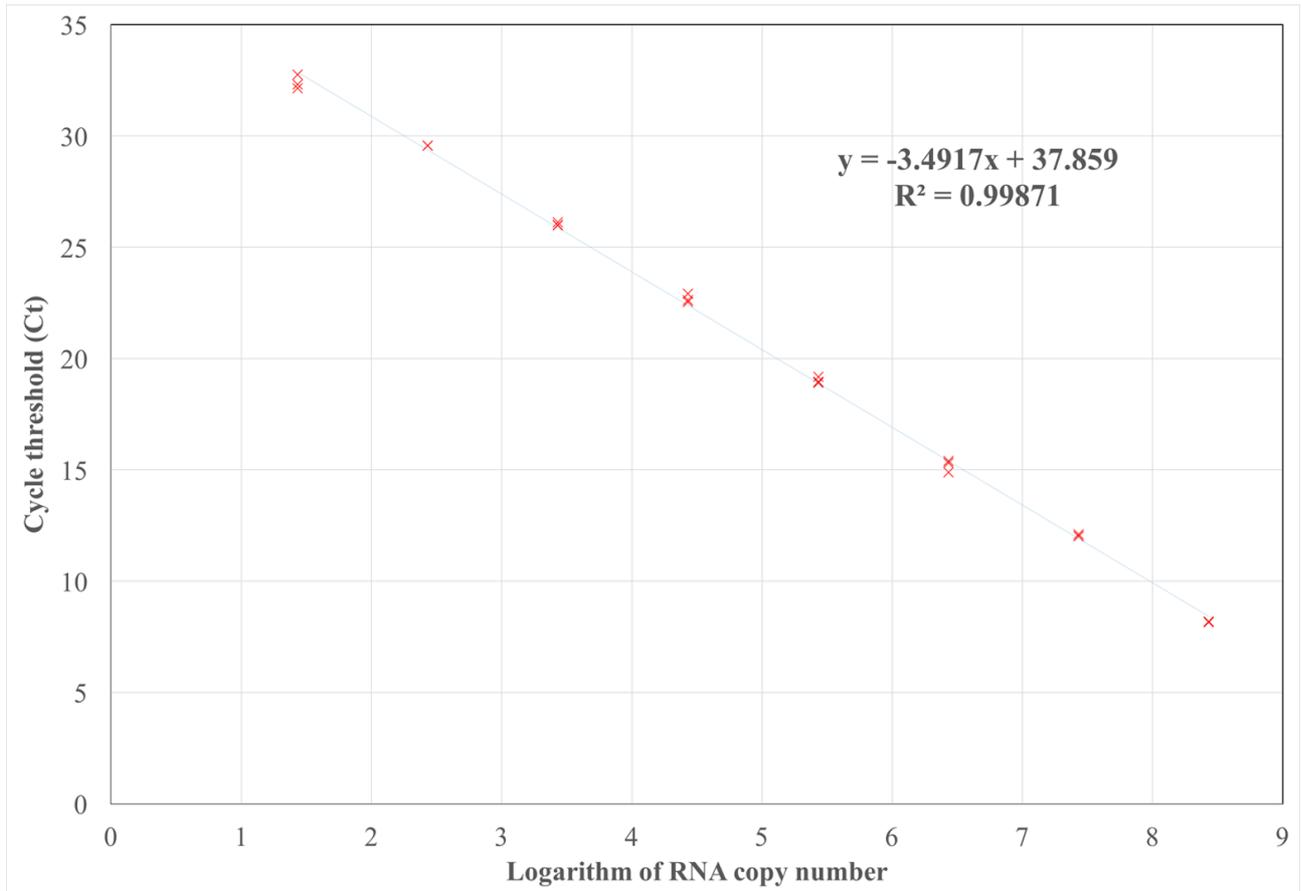
**Figura 29.** Evaluación del control interno de *Vitis vinifera* L. (PEP) en el ensayo *duplex* RT-PCR GPGV en tiempo real. Fueron analizadas por triplicado diluciones decimales seriadas (1:10) de un extracto de planta infectada con GPGV diluido en extracto de planta sana. Se muestran gráficos de amplificación mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real GPGV *singleplex* (azul) y GPGV-PEP *duplex* (rojo). Se incluyen dos controles negativos (en negro).

#### 4.3.2.4 Validación del método de detección basado en RT-PCR en tiempo real

##### Cuantificación absoluta y sensibilidad analítica

La cuantificación absoluta de GPGV se realizó utilizando cantidades conocidas de transcritos sintetizados *in vitro* de 490 nt a partir del plásmido pGEM-T-GPGV-6474F/6912R (véase 3.9). Se ensayaron por triplicado con la nueva técnica de RT-PCR en tiempo real varias diluciones decimales seriadas de los transcritos. Los resultados se utilizaron para construir una recta patrón y se pudo establecer un rango de cuantificación de  $3 \times 10^8$  a 30 copias de diana viral (Figura 30).

La pendiente de la recta (-3,4917) se utilizó para calcular la eficiencia de amplificación, que resultó ser del 93,43%, con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,9987. El límite de detección del método fue ligeramente superior cuando se analizó material vegetal, siendo 70 la cantidad mínima de copias virales detectadas.



**Figura 30.** Recta patrón obtenida con los valores de Ct (Cycle threshold) obtenidos a partir del análisis por triplicado de diluciones seriadas de transcritos sintéticos cuantificados. Se indica la ecuación matemática de la recta utilizada para cuantificar los ensayos de RT-PCR en tiempo real y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ).



## Resultados y discusión

La sensibilidad técnica del método de detección desarrollado se comparó con la del método de PCR en tiempo real previamente descrito basado en la química SYBR Green I (Bertazzon *et al.*, 2017). Para ello, se ensayaron diluciones de extractos de plantas infectadas con GPGV en extractos de plantas sanas (Tabla 6). La sensibilidad analítica en material vegetal de la RT-PCR en tiempo real diseñada en este estudio fue de dos órdenes de magnitud mayor que el método publicado anteriormente por Bertazzon *et al.*, (2017a).

**Tabla 6.** Comparación de sensibilidad técnica entre los métodos de detección de RT-PCR en tiempo real TaqMan y SYBR Green (Bertazzon *et al.*, 2017) para la detección de GPGV.

Método de RT-PCR	Región diana	Extracto sin diluir	Diluciones seriadas*						
			10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
TaqMan (Presente estudio)	MP/CP	+	+	+	+	+	-	-	-
SYBR Green (Bertazzon <i>et al.</i> , 2017)	RdRp	+	+	+	-	-	-	-	-
	CP	+	+	+	-	-	-	-	-

\* Diluciones decimales seriadas de material vegetal infectado con GPGV con extractos de plantas sanas.

### Especificidad y selectividad analíticas

Respecto a la inclusividad del método desarrollado, este fue capaz de diagnosticar con éxito los ocho aislados procedentes de Grecia, Eslovaquia y España utilizados como controles positivos en este estudio (véase 3.1 y 4.3.2.1). En lo referente a la exclusividad, el método no cruzó ni resultó positivo en plantas que presentaban infecciones mixtas con otros virus y viroides comunes de la vid como GRSPaV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GFLV, GFkV, GRVfV, HSVd y GYSVd-1 (Tabla 7).

La selectividad del método también resultó excelente ya que la RT-PCR diseñada fue capaz de detectar el virus GPGV en seis matrices o variedades diferentes evaluadas (Veltliner, Tragana, Assyrtiko, Garnacha, Bobal y Macabeo).

**Tabla 7.** Virus y viroides detectados mediante secuenciación masiva (HTS) en las muestras de vid seleccionadas para el análisis de exclusividad.

Muestra	Variedad	Virus y viroides de vid detectados por HTS
M2	Marsaoui	GLRaV-1; GLRaV-2; GLRaV-3; GVF; GVA; GVB; GRSPaV-1; GFLV; GYSVd-1; HSVd; GVL
U24	Bobal	GLRaV-1; GLRaV-3; GYSVd-1; HSVd
R1	Red Globe	GLRaV-2; GLRaV-3; GFkV; GVF; GVA; GFLV; GSyV-1; GYSVd-1; GVL; GYSVd-2; HSVd;
R35	Bobal	GLRaV-3; GRVfV; GFkV; GYSVd-1; HSVd
R5	Tempranillo	GLRaV-3; GRVfV; GRSPaV-1; GVA; GRGV; GYSVd-1; HSVd
R3	Razzegui	GPGV; GVF; GLRaV-1; GLRaV-2 GLRaV-3; GVA; GFkV; GVG; GVK; GFLV; GRSPaV-1; GVB; HSVd; GYSVd-1; GVL
TS1	Tempranillo	GRVfV; GFkV; GRSPaV-1; GVA; GLRaV-2; GAMaV; GYSVd-1; HSVd
Pin1	Crimson Seedless	GRSPaV-1; GLRaV-3; GVA; GFkV; GRGV; GRVfV; GYSVd-1; HSVd

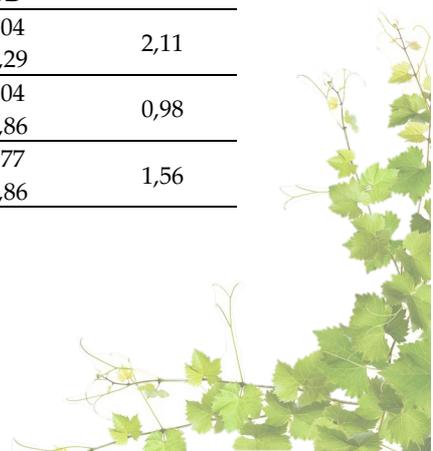
<sup>1</sup> Grapevine fanleaf virus (GFLV); grapevine fleck virus (GFkV); grapevine leafroll associated virus 1 (GLRaV-1); grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV-2); grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3); grapevine Red Globe virus (GRGV); grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV); grapevine Syrah virus 1 (GSyV-1); grapevine virus A (GVA); grapevine virus B (GVB); grapevine virus E (GVE); grapevine virus F (GVF); grapevine virus G (GVG); grapevine virus L (GVL); grapevine rupestris steam pitting-associated virus 1 (GRSPaV-1); grapevine rupestris steam pitting-associated virus 2 (RSPaV-2); grapevine yellow speckle viroid-1 (GYSVd-1); grapevine yellow speckle viroid-2 (GYSVd-2); hop stunt viroid (HSVd).

### Repetibilidad y reproducibilidad analítica

Los resultados de la repetibilidad y la reproducibilidad de la RT-PCR en tiempo real diseñada analizando tres muestras positivas para GPGV con títulos virales bajos mostró valores medios de Ct y desviaciones estándar (SD) que oscilaron entre  $29,77 \pm 0,86$  a  $32,45 \pm 1,2$ , mientras que los coeficientes de variación oscilaron entre valores del 0,98 % y 4,65%. Los resultados se detallan en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Repetibilidad de la RT-PCR en tiempo real para la detección de GPGV. Cada muestra se analizó en total en nueve repeticiones técnicas, empleándose tres termocicladores diferentes (StepOne Plus, QuantStudio y Roche 480) y realizándose tres repeticiones por instrumento.

Muestra	StepOne Plus		QuantStudio		Roche 480	
	Media Ct ± SD	CV (%)	Mean Ct ± SD	CV (%)	Mean Ct ± SD	CV (%)
RQ121	30,98 ± 1,3	3,32	30,63 ± 1,12	1,98	31,04 ± 0,29	2,11
RQ143	32,45 ± 1,2	2,67	31,47 ± 1,25	1,46	30,04 ± 0,86	0,98
RQ151	31,20 ± 1,6	4,65	30,25 ± 0,8	3,76	29,77 ± 0,86	1,56



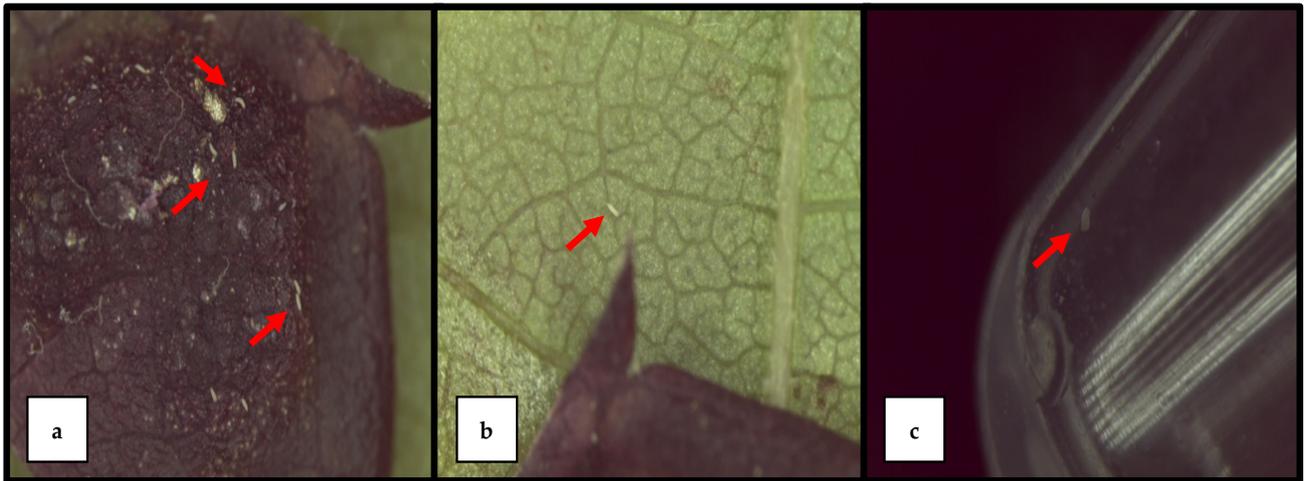
#### *4.3.2.5 Aplicación de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real para la detección de GPGV*

Se analizaron mediante la nueva RT-PCR cuantitativa en tiempo real 178 plantas de vid, tanto asintomáticas como con síntomas de moteado clorótico y deformación en las hojas, todas ellas procedentes de una prospección en la D.O. Utiel-Requena. Se detectaron 22 muestras positivas, tanto sintomáticas como asintomáticas, correspondientes a plantas de tres variedades locales de vid diferentes (Bobal, Macabeo y Garnacha). Los valores de Ct observados oscilaron entre 18,5 y 33,8, que correspondieron a títulos virales de  $1,1 \times 10^8$  y  $1,6 \times 10^3$  copias, con una prevalencia de 12,3% en la región prospectada. En 5 muestras analizadas, no se obtuvo amplificación del control interno de la planta por lo que se consideraron posibles falsos negativos y fueron descartadas de los cálculos. (Tabla 8).

Los resultados mostraron además, que 19 de las 22 muestras infectadas con GPGV estaban coinfectadas con otros virus causantes de enfermedad en la vid. Entre estos, GFLV fue el virus más prevalente, estando presente en 15 de las 22 muestras infectadas con GPGV, seguido por GFkV (5 muestras), GLRaV-2 (3 muestras) y GLRaV-3 (5 muestras) (Tabla 8).

#### *4.3.2.6 Determinación del título viral de GPGV en Colomerus vitis*

El resultado del análisis mediante esta RT-PCR cuantitativa en tiempo real de diferentes grupos de ácaros alimentados con hojas frescas infectadas con GPGV después de un periodo de adquisición de cinco días (Figura 31) mostró la habilidad de la misma para detectar GPGV en todas las muestras analizadas compuestas por agrupaciones de 15, 10 y 5 ácaros de la especie *C. vitis* y también en el análisis de ácaros individuales (Figura 32). El título viral medio de GPGV en un solo ácaro fue 306 copias ( $SE \pm 6$ ) y el título viral medio obtenido en los grupos de ácaros fue de 161 ( $SE \pm 15$ ) en nuestras condiciones experimentales.



**Figura 31.** Adquisición de GPGV; **a.** Agalla provocada por el ácaro *C. vitis* sobre una hoja infectada con GPGV; **b.** *C. vitis* situado sobre una hoja infectada con GPGV; **c.** *C. vitis* aislado en un tubo de micro centrífuga. Las flechas rojas señalan los ácaros

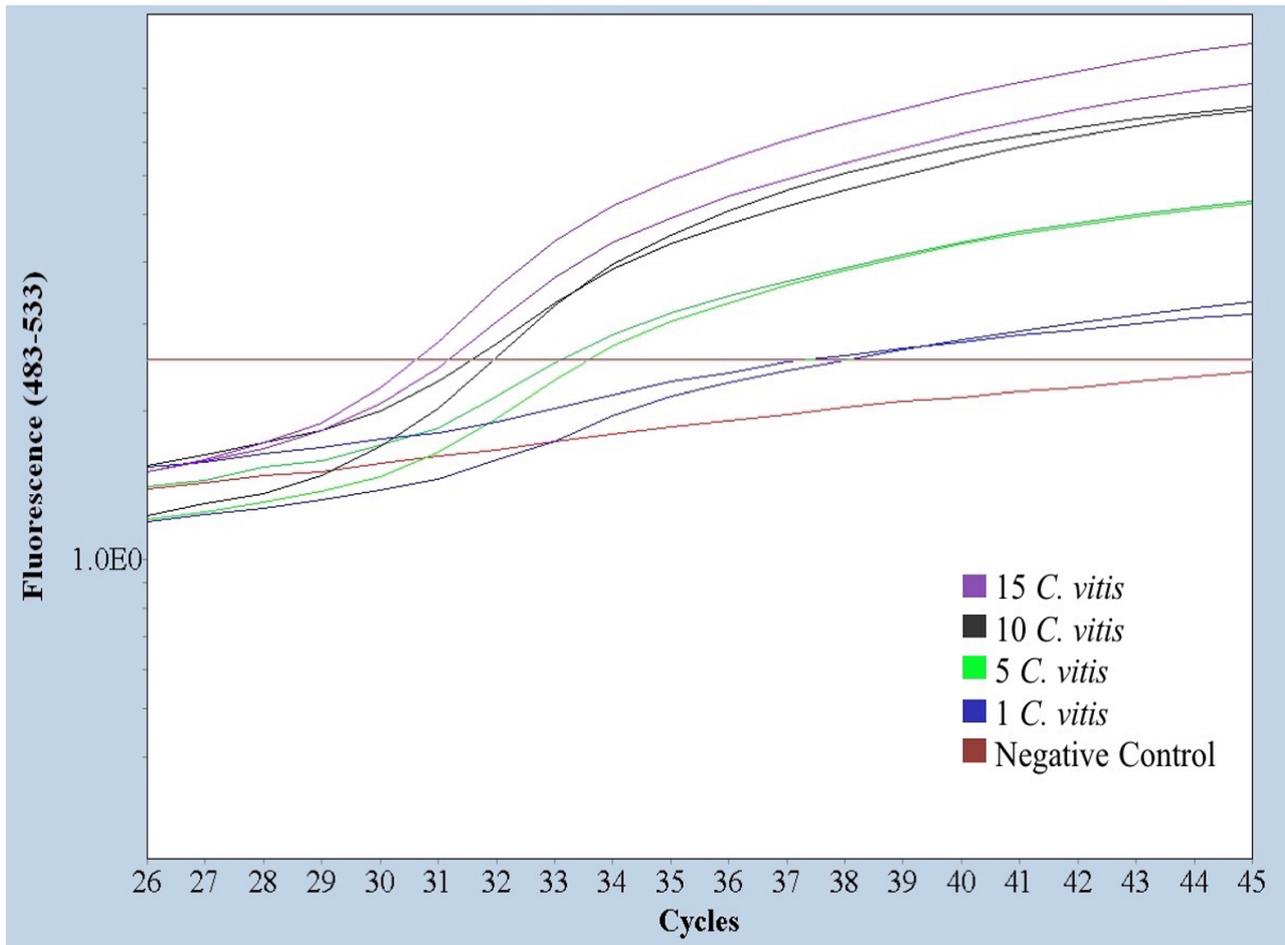


## Resultados y discusión

**Tabla 9.** Valores de Cts obtenidos mediante la RT-PCR en tiempo real diseñada tanto para la detección de GPGV como para el control interno PEP; se muestra también la sintomatología y presencia de otros virus de la vid en muestras positivas de GPGV prospectadas de la D.O. Utiel-Requena (España).

Muestra	Valores de Cts (GPGV <sup>a</sup> )	Título viral	Valores de Cts (PEP <sup>b</sup> )	Sintomatología	Otros virus <sup>c</sup>
RQ25	25.0	1.7 x 10 <sup>5</sup>	20.2	Moteado clorótico y deformación	GFLV, GLRaV-3
RQ30	23.4	3.9x 10 <sup>5</sup>	21.6	Moteado clorótico y deformación	GFkV, GFLV, GLRaV-3
RQ99	21.2	1.3 x10 <sup>6</sup>	21.3	Moteado clorótico	GFLV, GFkV, GLRaV-2
RQ106	23.1	4.5 x10 <sup>5</sup>	20.6	Asintomática	GLRaV-2
RQ108	23.2	4.4 x 10 <sup>5</sup>	21.5	Moteado clorótico	GFLV
RQ109	23.2	4.4 x 10 <sup>5</sup>	18.7	Moteado clorótico	GFLV
RQ110	23.2	4.4 x 10 <sup>5</sup>	19.7	Moteado clorótico	GFLV
RQ111	22.9	5.2 x 10 <sup>5</sup>	21.7	Moteado clorótico	GFLV
RQ113	20.5	1.8 x 10 <sup>6</sup>	21.6	Moteado clorótico	GFLV
RQ115	24.7	2.0 x 10 <sup>5</sup>	21.9	Moteado clorótico	GFLV
RQ116	26.6	7.5 x 10 <sup>4</sup>	22.0	Moteado clorótico	-
RQ117	18.5	1.1 x 10 <sup>8</sup>	21.9	Moteado clorótico	-
RQ118	27.5	4.6 x 10 <sup>4</sup>	22.8	Moteado clorótico	-
RQ121	32.3	3.6 x 10 <sup>3</sup>	22.7	Asintomática	GLRaV-3, GFkV
RQ124	30.9	7.8 x 10 <sup>3</sup>	23.5	Asintomática	GFLV
RQ125	23.2	4.3 x 10 <sup>5</sup>	22.7	Asintomática	GFLV, GLRaV-2
RQ136	24.2	2.6 x 10 <sup>5</sup>	20.3	Moteado clorótico	GFLV
RQ140	31.5	5.7 x 10 <sup>3</sup>	20.7	Moteado clorótico	GFLV
RQ142	32.6	3.2 x 10 <sup>3</sup>	20.5	Asintomática	GLRaV-2, GLRaV-3
RQ143	33.8	1.6 x 10 <sup>3</sup>	21.0	Moteado clorótico	GLRaV-2, GLRaV-3
RQ145	32.0	4.2 x 10 <sup>3</sup>	20.5	Moteado clorótico	GFLV
RQ150	33.2	2.3 x 10 <sup>3</sup>	20.7	Moteado clorótico	GFLV
RQ151	33.0	2.6 x 10 <sup>3</sup>	20.8	Moteado clorótico	GFLV
RQ160	32.7	3.0 x 10 <sup>3</sup>	24.0	Moteado clorótico	GFLV

<sup>a</sup> Grapevine Pinot gris virus (GPGV). <sup>b</sup> Fosfoenolpiruvato carboxilasa; <sup>c</sup> grapevine fanleaf virus (GFLV); grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV-2); grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) y grapevine fleck virus (GFkV).



**Figura 32.** Gráfica con las curvas de amplificación obtenidas para los diferentes grupos de *C. vitis* analizados mediante la RT-PCR en tiempo real: grupo de 15 ácaros en color púrpura, de 10 ácaros en color negro, de 5 ácaros en color verde y ácaros individuales en azul. Se incluye un control negativo de ácaros alimentados con hojas libres de GPGV en color marrón.

### 4.3.3 Discusión

Los métodos de detección basados en PCR cuantitativa en tiempo real se consideran “gold standard” y poderosas herramientas para realizar estudios no sólo de diagnóstico sino epidemiológicos. El nuevo método de RT-PCR desarrollado en este estudio amplifica una región que engloba parte de las ORFs MP y CP, que es una región de gran interés taxonómico y epidemiológico del genoma de GPGV (Glasa *et al.*, 2014; Saldarelli *et al.*, 2015).

Además, este método específico de detección permite realizar una cuantificación absoluta de GPGV tanto en material vegetal como en posibles vectores de transmisión del patógeno. El formato *duplex* incluyendo un control interno del gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP de *V. vinifera*) (Borges *et al.*, 2014) aumenta la información sobre posibles falsos negativos, que implica un resultado erróneo. De esta forma, la sensibilidad diagnóstica, es decir, la capacidad de la técnica para detectar los verdaderos positivos entre todas las plantas infectadas, calculada como verdaderos positivos / (verdaderos positivos + falsos negativos) (Altman & Bland, 1994), se incrementa con el método desarrollado. De hecho, algunas de las plantas analizadas en este estudio que mostraron resultados negativos para GPGV no proporcionaron una detección positiva en el gen PEP de la vid, lo cual permitió la identificación de estas muestras como posibles resultados falsos negativos. Respecto a la reproducibilidad y repetitividad de la técnica, de acuerdo a los coeficientes de variación observado en los resultados (<5%) para las muestras analizadas, indican la ausencia de desviaciones significativas en el rendimiento de la técnica.

Además, los resultados presentados en este trabajo muestran la ausencia de un efecto negativo de la reacción *duplex* sobre la sensibilidad técnica, ya que la señal obtenida por la reacción *duplex* fue similar a la obtenida en un ensayo *singleplex*. El método basado en sonda TaqMan, mostró una mejor sensibilidad en la detección de GPGV que un método PCR en tiempo real basado en la química SYBR Green I previamente descrito (Bertazzon *et al.*, 2017).

Este es el primer método de detección de GPGV que incluye la química TaqMan y un control interno de planta.

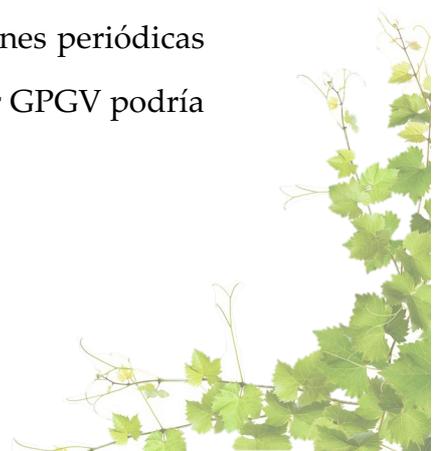
Este método permite la cuantificación absoluta del título viral de GPGV no solo en material vegetal sino también en uno de sus posibles vectores de transmisión (*C. vitis*) y se ha podido utilizar para determinar el título viral presente en un solo ácaro.

El título viral calculado en grupos de ácaros estimó un número promedio de copias por ácaro ( $161 \pm 15$ ) que se encontraba en el mismo orden de magnitud que el determinado en el análisis de los ácaros individuales ( $306 \pm 6$ ), lo que sugiere una distribución homogénea de la cantidad de partículas virales en la población de ácaros.

La prevalencia estimada del virus encontrado en los viñedos de la D.O. Utiel-Requena donde fue detectado el virus por primera vez en España fue del 12,3%. Destaca el hecho de que la mayoría de las plantas infectadas (17 de 22) presentaban síntomas de moteado clorótico y arrugamiento de las hojas relacionados con GPGV; mientras que solo una minoría de los aislados de GPGV detectados procedían de muestras asintomáticas. Por otra parte, en la mayoría de las plantas infectadas con GPGV, tanto sintomáticas como asintomáticas, se detectó la presencia de otros virus comunes de la vid, como GFLV, GFkV, GRLaV-2 y GLRaV-3, sin que se haya podido establecer una asociación clara entre la sintomatología observada y la presencia de estas infecciones mixtas.

Otros factores, como el título viral, parecen estar implicados en el desarrollo de los síntomas (Bertazzon *et al.*, 2017), destacando por tanto la importancia de poder realizar una cuantificación precisa y absoluta de GPGV, como la que es posible llevar a cabo con la técnica de detección desarrollada en este estudio. Sin embargo, en este trabajo, dado que los títulos virales de las plantas sintomáticas y asintomáticas fue muy similar, no se observó una asociación clara entre la sintomatología y el título viral de GPGV.

En este sentido, cabe destacar el reducido número de aislados analizados, consecuencia de la baja incidencia de GPGV en el área de cultivo de vid prospectada, que podría ser el motivo por el que nuestros resultados no corroboran esta observación previa. La realización de prospecciones periódicas más exhaustivas sobre diferentes viñedos españoles afectados por GPGV podría ayudar a abordar este problema.



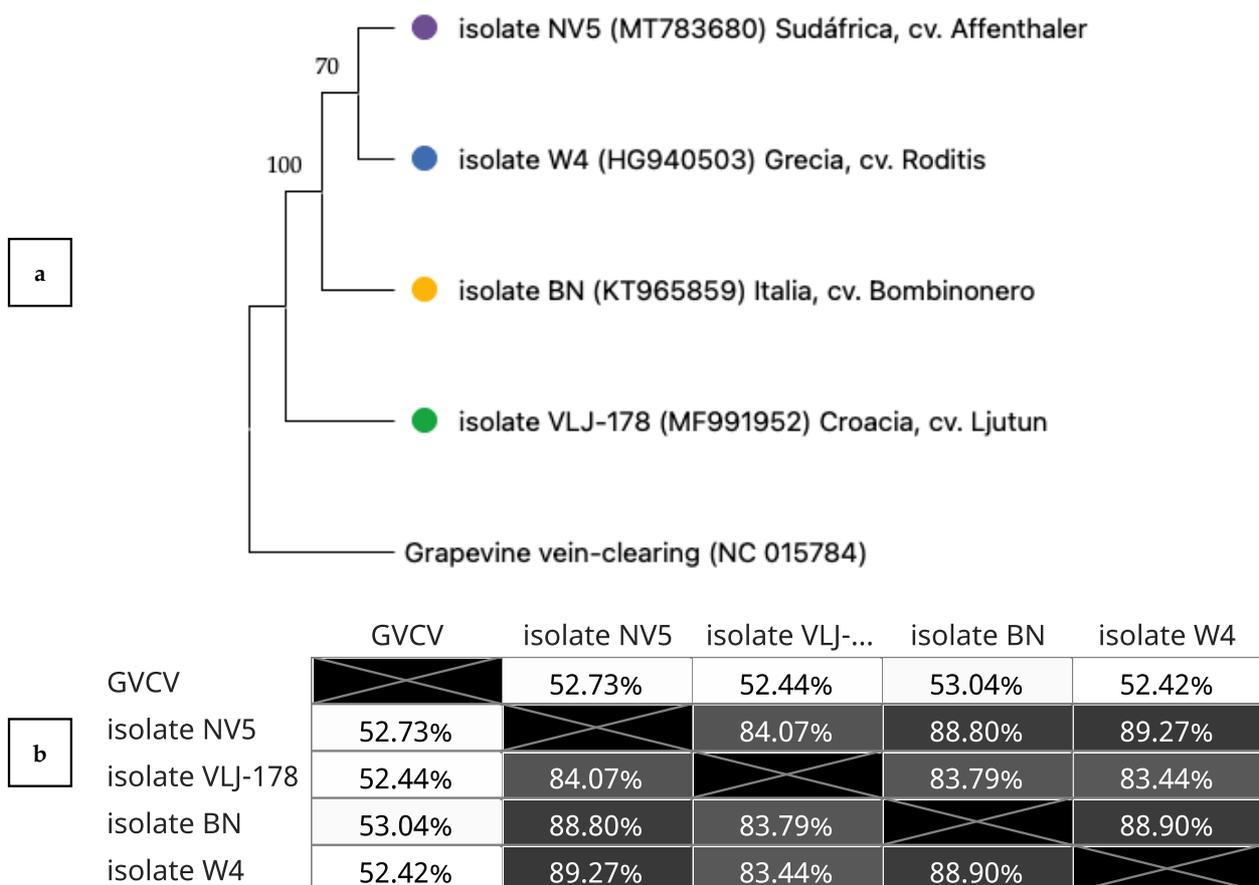
La caracterización molecular de la región genómica MP/CP de los aislados españoles ha permitido identificar un nuevo polimorfismo que no estaba descrito hasta ahora. Este nuevo polimorfismo, localizado un codón aguas abajo respecto al polimorfismo ya identificado por Saldarelli *et al.* (2015), conlleva la presencia de una señal de parada traduccional que determina la síntesis de una MP cinco aminoácidos más corta, en lugar de 6 como ocurre con el polimorfismo descrito por Saldarelli *et al.* (2015).

Además, el estudio filogenético de los aislados que tenían estos nuevos SNP mostró que se agrupaban en un clado diferente a los aislados virales portadores del polimorfismo descrito previamente. Esta divergencia filogenética sugiere que ambos polimorfismos son eventos evolutivos independientes, cuyo significado biológico se desconoce. En cualquier caso, el hallazgo de este nuevo polimorfismo proporciona nuevos datos que aumentan el conocimiento sobre la variabilidad genómica de este virus. La sintomatología observada sobre variedades locales españolas no parece estar asociada al polimorfismo MP/CP descrito por Saldarelli *et al.*, (2015) ni tampoco al nuevo polimorfismo detectado en este trabajo, lo que mantiene el desconocimiento sobre los marcadores moleculares relacionados con la sintomatología de GPGV. Esta problemática debe abordarse teniendo en cuenta múltiples factores que pueden interactuar en el desarrollo de la enfermedad asociada a este virus. Además, para profundizar en el conocimiento se deberá incluir un mayor número de aislados españoles, caracterizarlos con mayor profundidad, establecer sus relaciones filogenéticas y estudiar la susceptibilidad de las variedades locales. El empleo de clones infecciosos de GPGV será de utilidad para comprender la importancia biológica de este patógeno emergente.

## 4.4 Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus

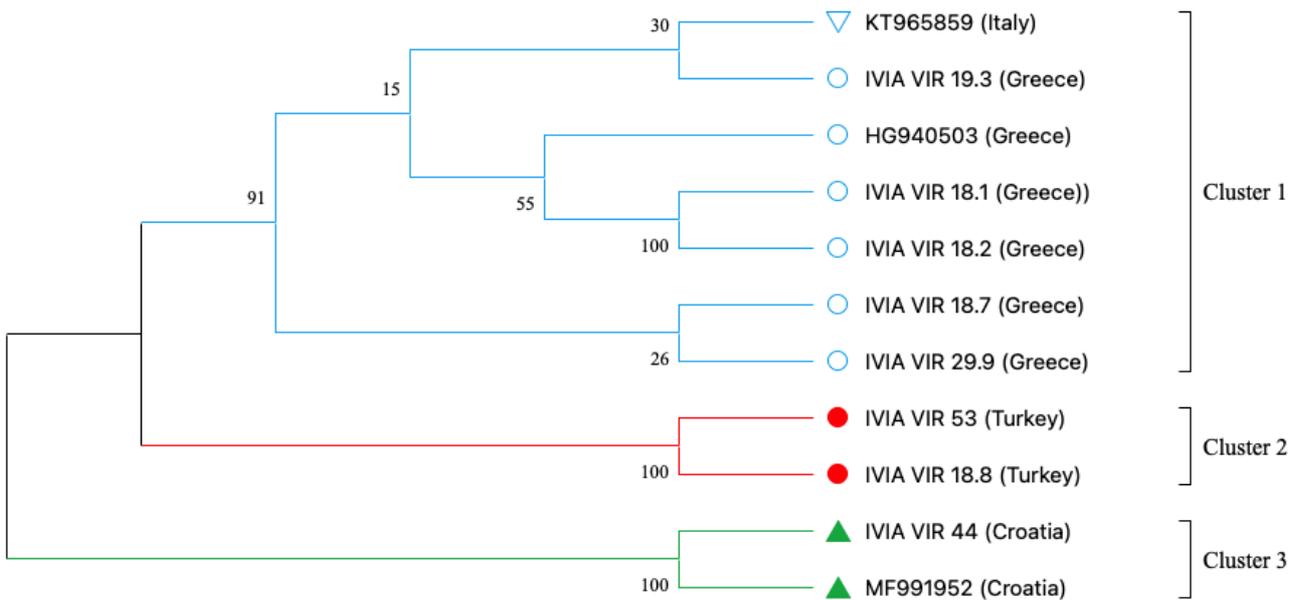
### 4.4.1 Caracterización molecular de GRLDaV

El análisis filogenético realizado con todos los genomas completos de GRLDaV disponibles en la base de datos correspondientes a los aislados W4 (Grecia), BN (Italia), VLJ-178 (Croacia) y NV5 (Sudáfrica) mostró la existencia de un alto grado de divergencia genética entre ellos, ya que cada aislado conforma un clado o agrupación diferente dependiendo del origen (Figura 33a). De igual forma, los porcentajes de identidad nucleotídica entre los diferentes aislados oscilan entre el 84% y el 89%, lo que pone de manifiesto un alto grado de diversidad intraespecífica de GRLDaV.



**Figura 33. a.** Análisis filogenético de cuatro genomas completos aislados del virus GRLDaV y un genoma completo del virus grapevine vein-clearing virus (GVC) usado como *outgroup*, por el método de máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*). El árbol se realizó utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos *General Time Reversible*, con un *bootstrap* de 500 réplicas; **b.** Matriz de identidad entre las secuencias nucleotídicas de los diferentes aislados.

Adicionalmente, en este estudio se amplificó y secuenció un fragmento genómico de 775 bp del dominio conservado de la RNaseH, utilizando los cebadores Badna-FP/Badna-RP, de nueve aislados de GRLDaV (IVIA\_VIR 19.3; IVIA\_VIR 18.1; IVIA\_VIR 18.2; IVIA\_VIR 18.7; IVIA\_VIR 18.8; IVIA\_VIR 29.9; IVIA\_VIR 44 y IVIA\_VIR 53) de tres orígenes geográficos distintos (Grecia, Turquía y Croacia). El alineamiento y posterior análisis filogenético realizado con las secuencias obtenidas mostró un alto grado de divergencia genética entre los aislados de diferentes orígenes, tal y como ocurre cuando se analizan los genomas completos. En el análisis de secuencias parciales se pudieron observar tres clados o *clusters* correspondientes a los aislados de Grecia e Italia (*cluster 1*), Turquía (*cluster 2*) y Croacia (*cluster 3*) (Figura 34).



**Figura 34.** Análisis filogenético de once aislados de GRLDaV de diferentes orígenes utilizando la secuencia parcial de 775 nt del dominio conservado de la RNaseH por el método máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*). El árbol se realizó utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos Tamura 3 con un bootstrap de 1000 réplicas.

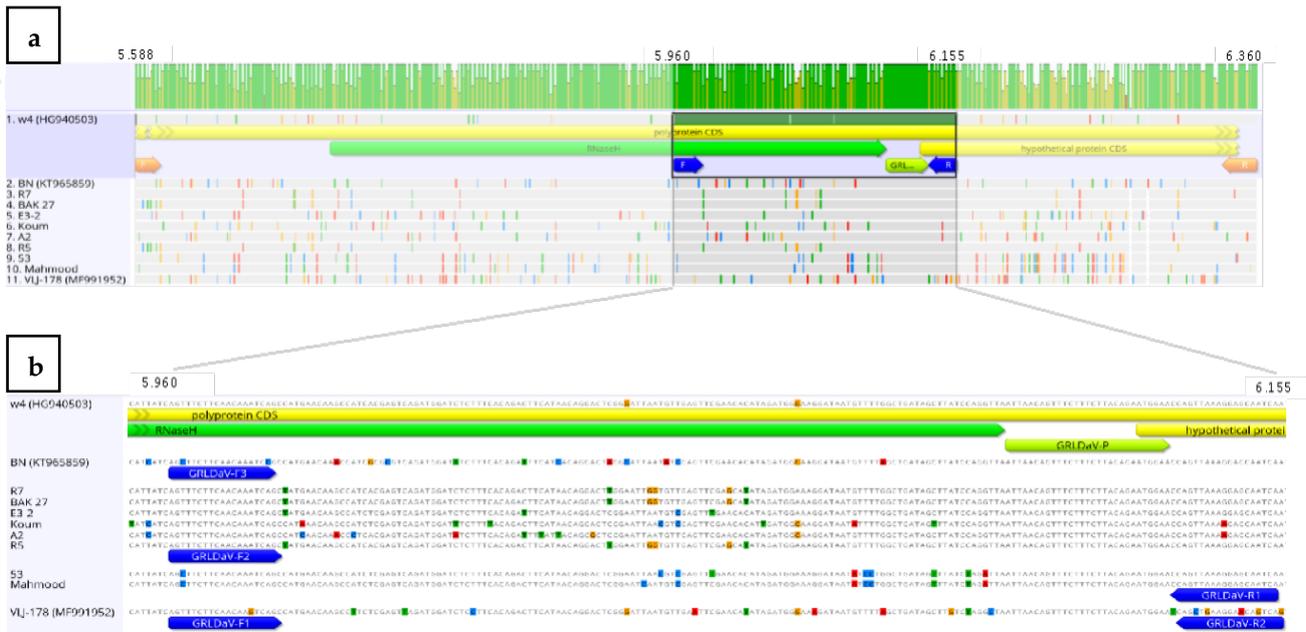
## 4.4.2 Desarrollo de un método de detección mediante PCR en tiempo real para GRLDaV

### 4.4.2.1 Diseño de cebadores y sonda

El estudio de variabilidad de las secuencias del dominio conservado de la RNaseH, realizado en el apartado 4.4.1, permitió la selección de una pequeña región de 211 nt conservada que mostraba una homología de secuencias que oscilaba entre el 85,78% y el 93,36% entre los diferentes aislados de GRLDaV estudiados.

Esta región se utilizó para el diseño de cebadores y sondas para la puesta a punto de métodos moleculares de detección de GRLDaV (Figura 35). Para cubrir toda la variabilidad observada en el alineamiento y evitar el uso de cebadores excesivamente degenerados, se diseñaron cinco cebadores diferentes que amplifican una secuencia de 196 nt (desde la posición 5960 hasta 6155 en la secuencia genómica de referencia NC\_027131.1): GRLDaV-F1 (5'-AGT TTC TTC AAC AAG TCA GC-3'), GRLDaV-F2 (5'-AGT TTC TTC AAC AAA TCA GC-3'), GRLDaV-F3 (5'-AGC TTC TTC AAC AAA TCC G-3'), GRLDaV-R1 (5'-TGA TTG CTC RTT TAA CTG G-3') y GRLDaV-R2 (5'-GAC TGT TCC TTC AGC TG-3'). Una sonda TaqMan ZNA fue diseñada dentro del fragmento, GRLDaV-P (5'-6-FAM-ATT AAC AGT TTC TTT CTT ACA GAA TGG AA-BHQ1-ZNA4-3').

El estudio *in silico* mostró que los cebadores GRLDaV-F1, GRLDaV-F2 y GRLDaV-F3, alineaban perfectamente con los aislados croatas, turcos e italianos/griegos. El cebador GRLDaV-R1, al que se le incluyó una degeneración, alineó perfectamente con todos los aislados a excepción del croata, por ello se diseñó un quinto cebador específico para el aislado croata, el GRLDaV-R2. Para el diseño de la sonda TaqMan GRLDaV-P se utilizó una región que alineaba perfectamente con todos los aislados (Figura 35b).



**Figura 35:** a. Alineamiento de la secuencia parcial de 775 pb de la ORF4 (RNaseH) de diferentes aislados de grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus, procedentes de distintas regiones geográficas; b. Se muestra la región diana de la PCR en tiempo real (196 nt) y los cebadores (flechas azules) y sonda (flecha verde) diseñados.

#### 4.4.2.2 Detección de aislados de GRLDaV mediante PCR en tiempo real

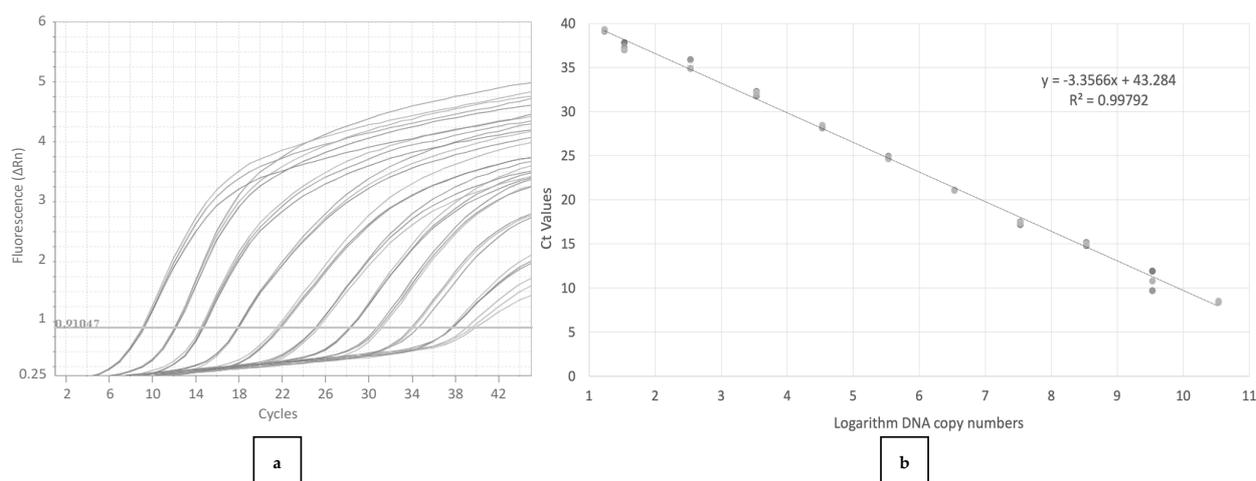
Se analizaron 22 aislados de GRLDaV procedentes de Grecia, Turquía, Italia y Croacia (véase 3.11.2.2). Las tres réplicas de todas las muestras analizadas fueron positivas para GRLDaV, con valores medios de Ct y desviación estándar de  $17.24 \pm 0.39$  a  $32.90 \pm 0.42$ . No se detectó señal en ninguna de las plantas de vid saneadas, de las variedades Valencí blanc, Monastrell y Bobal, utilizadas como controles negativos (véase 3.1).

#### 4.4.2.3 Validación del método de detección basado en PCR en tiempo real

##### Cuantificación absoluta y sensibilidad analítica

Para la cuantificación absoluta de la técnica, se utilizaron diluciones de cantidades conocidas del plásmido pGEM-T- GRLDaV-F2/R2 construido, que contenía la región genómica diana de GRLDaV de la PCR en tiempo real diseñada. Los resultados obtenidos del análisis de las diluciones de DNA plasmídico se utilizaron para construir una recta patrón, estableciendo un rango de cuantificación de  $3 \times 10^{10}$  a 20 copias de diana viral.

La pendiente de la recta estándar (-3,3566) se utilizó para calcular la eficiencia de amplificación, que resultó ser del 98,57%, con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,99 (Figura 36).



**Figura 36 a.** Gráfico de las curvas de amplificación obtenidas mediante la PCR en tiempo real de GRLDaV a partir de diluciones decimales seriadas, analizadas por triplicado, del plásmido que contiene la región diana de la PCR; **b.** Recta estándar de cuantificación generada. Se indican tanto la ecuación matemática de la recta como el coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

La sensibilidad analítica de la PCR en tiempo real determinada en material vegetal, fue evaluada utilizando tanto extractos crudos como DNA purificado. El límite de detección del método con DNA fue de 30 copias virales, mientras que el límite de detección de la técnica empleando directamente extracto crudo fue de 4.400 copias virales (Tabla 10).

Además, se comparó la sensibilidad del método con otros dos métodos de detección previamente descritos, una PCR convencional específica de género (Yang *et al.*, 2003) y una PCR en tiempo real específica de GRLDaV basada en la química SYBR Green I (Maliogka *et al.*, 2015). Los resultados de esta comparación mostraron que la PCR en tiempo real desarrollada en este estudio es mucho más sensible que las técnicas descritas anteriormente, siendo cinco órdenes de magnitud más sensible que la PCR convencional y dos órdenes de magnitud más sensible que la PCR en tiempo real SYBR Green I (Tabla 10). Es destacable mencionar, que, incluso utilizando extractos crudos, el método aquí desarrollado exhibió una mayor sensibilidad que las herramientas de diagnóstico actualmente disponibles utilizando DNA purificado.

**Tabla 10.** Sensibilidad analítica y comparación de la sensibilidad analítica de la PCR en tiempo real desarrollada en este trabajo con dos métodos de detección de grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV) descritos anteriormente (Yang *et al.*, 2003; Maliogka *et al.*, 2015).

Diluciones seriadas <sup>1</sup>	PCR en tiempo real (este estudio)		SYBR Green PCR en tiempo real (Maliogka <i>et al.</i> , 2015)	PCR convencional (Yang <i>et al.</i> , 2003)
	Título viral <sup>2</sup> (DNA purificado)	Señal (extracto crudo)	Señal (DNA purificado)	Señal (DNA purificado)
Sin diluir	5.22 x 10 <sup>6</sup>	+	+	+
10 <sup>-1</sup>	7.18 x 10 <sup>8</sup>	+	+	+
10 <sup>-2</sup>	6.31 x 10 <sup>7</sup>	+	+	+
10 <sup>-3</sup>	1.01 x 10 <sup>6</sup>	+	+	+
10 <sup>-4</sup>	2.74 x 10 <sup>5</sup>	+	+	-
10 <sup>-5</sup>	2.70 x 10 <sup>4</sup>	+	+	-
10 <sup>-6</sup>	4.40 x 10 <sup>3</sup>	+	+	-
10 <sup>-7</sup>	3.30 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-
10 <sup>-8</sup>	2.88 x 10 <sup>1</sup>	-	-	-

<sup>1</sup> Diluciones seriadas (1:10) de extracto de vid infectado con GRLDaV diluido en extracto de vid de planta sana. <sup>2</sup> Media del título viral de tres réplicas determinado por la cuantificación de PCR en tiempo real.

### *Especificidad y selectividad analíticas*

Los resultados de la inclusividad mostraron que el método desarrollado es capaz de detectar hasta 22 aislados diferentes de GRLDaV procedentes de cuatro orígenes geográficos (Grecia, Turquía, Italia y Croacia) (véase 3.11.2.2). Los resultados del análisis de selectividad del método muestran que la PCR desarrollada es capaz de detectar a GRLDaV hasta en 14 variedades de vid diferentes (véase 3.11.2.2) sin verse afectada la capacidad de detección del método.

Los resultados de la exclusividad de la PCR en tiempo real muestran la ausencia de falsos positivos en plantas de diferentes variedades infectadas con virus y viroides comunes de la vid tales como: GFLV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-1-3, GRGV, GRVfV, GSyV-1, GVA, GVB, GVE, GVF, GVG, GVL, GRSPaV, GYSVd-1, GYSVd-2 y HSVd (véase 4.3.2.3, Tabla 7).

### *Repetibilidad y reproducibilidad analítica*

Los resultados de la repetibilidad y la reproducibilidad de la qPCR en tiempo real evaluada analizando siete muestras positivas para GRLDaV que contenían títulos virales relativamente bajos mostró valores medios de Ct y desviaciones estándar que oscilaron entre  $22,04 \pm 1,9$  a  $35,81 \pm 0,6$  en el caso de los análisis sobre extracto crudo, y valores de  $19,82 \pm 0,73$  a  $33,21 \pm 1,33$ , en el caso de los análisis realizados sobre DNA purificado. El coeficiente de variación observado fue inferior al 9% y varió de 0,78 a 8,65 (extracto crudo) y de 1,14 a 8,99 (DNA purificado) (Tabla 11).



**Tabla 11.** Repetibilidad de la PCR en tiempo real diseñada. Cada muestra se analizó en nueve repeticiones técnicas en tres termocicladores diferentes (tres repeticiones por instrumento) analizando tanto extractos crudos como DNA purificado.

Muestra	Extracto crudo						DNA purificado					
	StepOne Plus		QuantStudio		Roche 480		StepOne Plus		QuantStudio		Roche 480	
	Mean Ct ± SD	CV (%)										
60.5	28.28 ± 1.42	5.03	30.63 ± 1.12	1.82	33.04 ± 0.29	0.91	22.95 ± 1.11	5.56	26.72 ± 0.63	2.37	27.41 ± 0.94	3.46
60.11	22.04 ± 1.90	8.65	24.74 ± 1.25	5.08	26.04 ± 0.86	3.32	20.94 ± 0.92	8.90	22.48 ± 1.92	8.54	23.09 ± 1.10	4.77
60.15	26.90 ± 1.6	6.22	28.92 ± 0.9	3.17	29.77 ± 0.86	2.91	21.09 ± 0.60	2.87	24.89 ± 0.43	1.62	25.82 ± 0.29	1.14
60.16	25.91 ± 1.16	6.31	27.86 ± 1.5	2.32	31.31 ± 0.45	1.12	20.73 ± 1.70	3.35	23.30 ± 0.49	2.13	23.97 ± 0.70	13.65
60.17	27.78 ± 1.48	5.33	29.21 ± 0.22	0.78	30.36 ± 0.36	1.19	21.15 ± 0.52	5.24	24.55 ± 0.29	1.19	26.04 ± 0.76	1.72
60.21	32.05 ± 2.08	6.51	35.81 ± 0.6	5.89	30.52 ± 0.23	1.16	27.05 ± 0.56	2.07	30 ± 0.42	1.43	33.21 ± 1.33	8.99
60.23	22.95 ± 1.42	6.23	24.70 ± 0.3	1.25	27.12 ± 0.61	2.25	19.82 ± 0.73	4.69	21.98 ± 0.88	4.01	23.76 ± 1.41	5.94

#### 4.4.2.4 Aplicación de la PCR en tiempo real para la detección de GRLDaV

El análisis mediante el método PCR en tiempo real desarrollado en este estudio, llevado a cabo con 65 plantas de vid prospectadas aleatoriamente procedentes de Grecia, mostró que 15 plantas fueron positivas para GRLDaV con valores de Ct que oscilaron entre 17,62 y 27,19, lo que implica una prevalencia del 23% en la región Griega.

#### 4.4.2.5 Detección y cuantificación de GRLDaV en cochinillas

Los resultados de aplicar el método PCR para GRLDaV para la detección y cuantificación de la carga viral en las dos especies de cochinillas comunes de la vid, *P. citri* y *P. viburni* mostró que el virus era capaz de ser adquirido por ambas especies de cochinillas.

Los resultados de la cuantificación de la carga viral media y sus desviaciones estándar de todas las muestras de insectos, incluyendo tanto los títulos virales medios para las agrupaciones como el de las cochinillas evaluadas individualmente, se muestran en la tabla 12.

En las condiciones experimentales de este estudio (véase 3.2.1), el título viral que se determinó en cochinillas individuales de *P. citri* osciló entre 99 y 668 copias virales, con un título viral medio de  $321,76 \pm 201,97$ . La cuantificación del título viral en los grupos de cochinillas varió de 128 a 1300 copias (para los grupos de 2 insectos) y de 234 a 1325 copias (para los grupos de 4 insectos), con un título viral medio de  $651,11 \pm 345,59$  y  $987,33 \pm 233,93$  copias, respectivamente ( $325,55 \pm 172,79$  y  $246,83 \pm 108,91$  copias por cada individuo de *P. citri*).

En el caso de *P. viburni*, el título viral de las cochinillas individuales analizadas osciló entre las 54 y 192 copias, con un título viral medio de  $136,53 \pm 45,61$ . En el caso de la cuantificación de las agrupaciones de cochinillas, los valores oscilaron entre 271 a 691 copias (para los grupos de 2 insectos) y de 179 a 659 (para los grupos de 4 insectos), lo que representa un título viral medio de  $466,66 \pm 155,49$  y  $506,11 \pm 194,10$ , respectivamente ( $233,22 \pm 77,74$  y  $126,53 \pm 48,52$  copias por cada individuo de *P. viburni*). Las cochinillas alimentadas sobre hojas sanas (libres de GRLDaV) de vid no mostraron señal de amplificación.

Por último, respecto a los ensayos de transmisión realizados con ambas especies de cochinillas, *P.citri* y *P. vivburni* resultaron negativos bajo las condiciones experimentales ensayadas en este estudio.



## Resultados y discusión

**Tabla 12.** Cuantificación de los títulos virales medios y desviaciones estándar (SD) de todas las muestras de insectos cuantificadas mediante la PCR en tiempo real. Se incluyen los títulos virales medios para las agrupaciones de las cochinillas y los títulos virales para las cochinillas individuales. En negrita títulos virales máximos y mínimos.

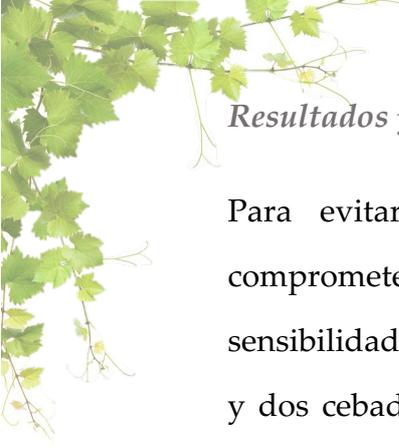
Número de insectos	Muestra	Título viral	Título viral por cochinilla	Media del título viral $\pm$ SD	Media del título viral por cochinilla $\pm$ SD
<b>1</b> <i>Planococcus citri</i>	1.1	545		321.76 $\pm$ 201.97	-
	1.2	<b>99</b>			
	1.3	284			
	1.4	342			
	1.5	294	-		
	1.6	346			
	1.7	<b>668</b>			
	1.8	317			
	1.9	0			
<b>2</b> <i>Planococcus citri</i>	2.1	<b>1300</b>	650	651.11 $\pm$ 345.59	325.55 $\pm$ 172.79
	2.2	<b>128</b>	64		
	2.3	756	378		
	2.4	451	225.5		
	2.5	991	495.5		
	2.6	726	363		
	2.7	382	191		
	2.8	581	290.5		
	2.9	545	272.5		
<b>4</b> <i>Planococcus citri</i>	4.1	<b>234</b>	78	987.33 $\pm$ 233.93	246.83 $\pm$ 108.91
	4.2	885	295		
	4.3	1232	410.6		
	4.4	945	315		
	4.5	936	312		
	4.6	923	307.6		
	4.7	<b>1325</b>	441.6		
	4.8	1235	411.6		
	4.9	1168	389.33		
<b>1</b> <i>Pseudococcus viburni</i>	1.1	174		136.53 $\pm$ 45.61	-
	1.2	138			
	1.3	92			
	1.4	<b>192</b>			
	1.5	<b>54</b>	-		
	1.6	174			
	1.7	159			
	1.8	146			
	1.9	100			
<b>2</b> <i>Pseudococcus viburni</i>	2.1	295	73.75	466.66 $\pm$ 155.49	116.61 $\pm$ 38.87
	2.2	498	124.5		
	2.3	280	70		
	2.4	<b>691</b>	172.75		
	2.5	558	139.5		
	2.6	428	107		
	2.7	<b>271</b>	67.75		
	2.8	588	147		
	2.9	589	147.25		
<b>4</b> <i>Pseudococcus viburni</i>	4.1	<b>179</b>	89.5	506.11 $\pm$ 194.10	253.06 $\pm$ 97.05
	4.2	299	149.5		
	4.3	277	138.5		
	4.4	657	328.5		
	4.5	<b>659</b>	329.5		
	4.6	619	309.5		
	4.7	629	313.5		
	4.8	616	308		
	4.9	620	310		

#### 4.4.3 Discusión

Uno de los retos a los que se enfrentan los métodos actuales de diagnóstico se centra en la mejora de la especificidad de las técnicas. Los métodos cuantitativos de detección basados en PCRs en tiempo real son herramientas de diagnóstico muy sensibles que sirven para el control y la gestión de enfermedades virales. Sin embargo, en ocasiones estos métodos pueden mostrar problemas de especificidad importantes (Morán *et al.*, 2020), y es por ello que la validación de los mismos es necesaria para el desarrollo de un correcto protocolo de detección empleado para el diagnóstico (EPPO, 2021).

En este estudio, centrado en el diseño de una PCR en tiempo real específica para la detección y cuantificación absoluta del virus GRLDaV, se describe el desarrollo de un método específico de detección que permite además la cuantificación absoluta de GRLDaV, un virus de la vid incluido en la lista de alertas de la EPPO (EPPO, 2018). Esta nueva técnica desarrollada es capaz de realizar una detección cuantitativa, específica y fiable de GRLDaV, tanto en material vegetal como en cochinillas de las especies *P. citri* y *P. viburni*, un paso clave para prevenir la propagación de este patógeno en los viñedos europeos y mediterráneos.

Las secuencias genómicas del virus GRLDaV muestran un alto grado de variabilidad que, como se ha visto en este estudio, parece estar claramente relacionada con la distribución geográfica del virus. Esta diversidad genética podría comprometer el diagnóstico fiable de este patógeno. Con el objetivo de diseñar un método de detección capaz resolver esta problemática, se analizaron las secuencias virales de todas las ubicaciones geográficas conocidas en las que se ha encontrado GRLDaV. En el trabajo se ha demostrado que el método qPCR en tiempo real desarrollado cubre específicamente toda la diversidad de GRLDaV conocida, empleando además una única sonda TaqMan que hibrida en una región conservada del dominio RNasa H que se localiza en la ORF4 del genoma del virus.



## *Resultados y discusión*

Para evitar el uso de cebadores altamente degenerados que podrían comprometer las concentraciones eficientes de cebadores, y por tanto la sensibilidad de detección, se diseñaron cinco cebadores, tres cebadores directos y dos cebadores reversos, que flanquean una pequeña región que contiene la secuencia diana de la sonda.

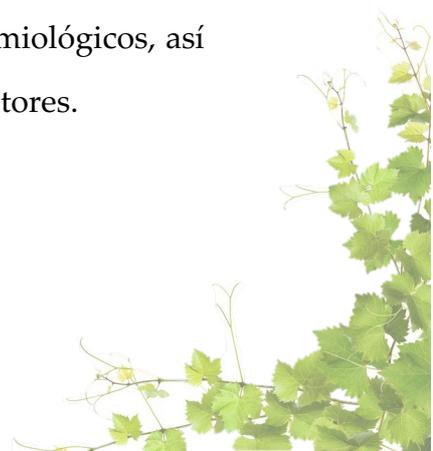
Los resultados han demostrado que la técnica exhibe, no solo un alto grado de especificidad hacia su diana, sino también un alto nivel de sensibilidad en la detección de GRLDaV. Además, este método también se puede aplicar con éxito para la cuantificación absoluta de GRLDaV tanto en material vegetal como en cochinillas, potenciales vectores del virus. El método de detección de GRLDaV aquí descrito ha sido validado evaluando su sensibilidad analítica, especificidad analítica, selectividad, repetibilidad y reproducibilidad de acuerdo con las directrices de la EPPO.

El método mostró una alta sensibilidad en la detección de GRLDaV utilizando tanto extractos crudos (sin purificación de ácidos nucleicos) como DNA purificado. De hecho, la sensibilidad de la técnica fue mucho mayor que la sensibilidad alcanzada por dos métodos de detección previamente reportados basados en la PCR genérica convencional (Yang *et al.*, 2003) y la PCR en tiempo real SYBR Green (Maliogka *et al.*, 2015). La comparación entre las tres técnicas mostró que la sensibilidad del nuevo método era dos órdenes de magnitud mayor con respecto a la PCR convencional y cinco órdenes de magnitud mayor con respecto a la PCR en tiempo real SYBR Green, con un límite de detección en torno a 30 copias en material vegetal naturalmente infectado. Además, la qPCR en tiempo real desarrollada en este trabajo fue capaz de detectar el virus en extractos crudos, mostrando una sensibilidad similar a la del método en tiempo real previamente descrito para muestras de DNA purificado. Este resultado plantea la posibilidad de evitar los pasos de extracción de ácido nucleico para pruebas rápidas, aunque la sensibilidad es dos órdenes de magnitud mayor cuando se analiza el DNA purificado.

En cualquier caso, el método desarrollado en este trabajo proporciona una mayor sensibilidad en la detección de GRLDaV en comparación con las herramientas de diagnóstico existentes. Además, también se logró validar la especificidad y selectividad de nuestro método. El ensayo resultó ser muy específico según los resultados obtenidos tanto para la inclusividad como para la exclusividad.

Todos los aislados de GRLDaV analizados de diferentes orígenes geográficos que cubren la diversidad viral conocida fueron detectados con éxito por la técnica. Por otro lado, ninguna de las plantas de vid saneadas, ni las vides libres de GRLDaV, pero infectadas con varios virus comunes de la vid mostraron resultados positivos en nuestro ensayo, poniendo de manifiesto el alto nivel de especificidad analítica del método. Además, la selectividad del ensayo también se demostró, evaluando diferentes cultivares de vid y mostrando resultados satisfactorios. Finalmente, también se demostró la repetibilidad y reproducibilidad del método; se realizaron con éxito una serie de nueve repeticiones técnicas de siete muestras de títulos virales relativamente bajos analizadas en tres termocicladores diferentes, en días diferentes y por diferentes operadores. El coeficiente de variación observado en los resultados del análisis fue inferior al 9% para todas las muestras analizadas, lo que indica la ausencia de desviaciones significativas en el rendimiento de la técnica.

Se aplicó con éxito la técnica validada para la detección de GRLDaV en dos especies de pseudocóccidos, *P. citri* y *P. viburni*. En nuestras condiciones experimentales, ambas especies de cochinillas fueron capaces de adquirir el virus, y el método de PCR diseñado detectó y cuantificó con éxito el virus GRLDaV. Queda por estudiar si estas especies de cochinillas son realmente vectores de transmisión de este virus. Sin embargo, ha quedado demostrada la capacidad de esta técnica para ser aplicada a esos estudios epidemiológicos, así como para el control de la propagación del virus mediada por vectores.



## 4.5 Identificación de un virus de la familia *Myomonaviridae* presente en vides con sintomatología de etiología desconocida

### 4.5.1 Caracterización de *penicillimonavirus gammaplasmopara*

A finales de la primavera de 2018, se encontraron síntomas virales atípicos, que consistían en un enrollado de la hoja hacia el haz (Figura 37), los cuales eran muy diferentes al síndrome del enrollado de la hoja asociado a GLRaVs (véase 1.3), en cinco plantas de la variedad Crimson seedles. En 2019, tras el periodo de dormancia y la brotación de las vides, se observó una pérdida de vigor progresiva en las plantas. Tras el siguiente periodo de dormancia, en la primavera de 2020, cuatro de las plantas murieron y solo una de ellas rebrotó sin manifestar los síntomas anteriormente mencionados. Durante los dos años de seguimiento de las plantas estas presentaron indicios leves de la presencia de oídio.

#### 4.5.1.1 Detección de RNAs de hebra negativa relacionados con el orden *Mononegavirales*

En el análisis por secuenciación masiva del RNA total obtenido de dos de estas plantas (Pin1 y 49.3) se obtuvo un número total de *reads* comprendido entre los 41.826.788 y los 48.982.950, después de la eliminación de los adaptadores y del control de calidad. El ensamblaje *de novo* realizado con el *software* CLC Genomics Workbench (véase 3.4.2) se llevó a cabo con un total de 853.265 y 8.642.008 de *reads* obtenidas tras la sustracción del genoma de la planta. Los *contigs* obtenidos (14.905 y 19.543, respectivamente) fueron analizados por BLASTN contra la base de datos RefSeq accesible en 2019. Los resultados mostraron la presencia en estas muestras de varios virus y viroides de vid conocidos (Tabla 13).



**Figura 37** Síntomas en las plantas de vid analizadas en este capítulo: de la **a-d**. enrollamiento de la hoja en dirección del haz de la hoja y arrugamientos de la hoja en la superficie del haz de la hoja marcada con flechas blancas.

**Tabla 13.** Resultados del análisis de datos de secuenciación masiva (HTS) y virus de vid y viroides detectados por análisis BLASTN / X contra secuencias RefSeq de tres plantas de vid evaluadas en este estudio.

Muestras	Número total de reads <sup>1</sup>	Contigs de novo	Virus y viroides de la vid <sup>2</sup>
Pin1	8.642.008	14.905	GRSPaV-1; GLRaV-3; GVA; GFkV; GRGV; GRVfV; GYSVd-1; HSVd
49.3	853.265	19.543	GRSPaV-1; HSVd

<sup>1</sup>Después de la sustracción del genoma de planta. <sup>2</sup> Virus y viroides de vid detectados y anotados empleando BLASTN/BLASTX contra la base de datos RefSeq (NCBI, 2019): grapevine rupestris stem pitting associated virus 1 (GRSPaV-1); grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3); grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1); grapevine virus A (GVA); grapevine fleck virus (GFkV); grapevine Red Globe virus (GRGV); grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV); grapevine yellow speckle viroid-1 (GYSVd-1); hop stunt viroid (HSVd).



## Resultados y discusión

Además de la detección de los virus depositados en la base de datos RefSeq (accesible en 2019) que se observan en la tabla 13, en las muestras Pin1 y 49.3, se identificó un *contig* (C-I), de un tamaño de 6.155 nt, que al ser analizado con la herramienta de búsqueda de dominios conservados mostró la presencia de dos dominios proteicos relacionados con la RdRp del orden de los Mononegavirales: la región V de la caperuza de RNAm (*e-value*  $2.5 \times 10^{-102}$ ), y un dominio L de la RNA polimerasa (*e-value*  $9,9 \times 10^{-15}$ ) (Figura 38a).

Otro *contig* de menor tamaño, denominado C-II, de 4.564 nt de tamaño (Figura 38b), fue ensamblado *de novo* a partir de las *reads* de HTS de las muestras Pin1 y 49.3 (Figura 38b). El *contig* C-II no mostró homología significativa por BLASTN/X con ninguna secuencia disponible en las bases de datos utilizadas en este estudio (véase 3.6). Sin embargo, la búsqueda de codones de inicio en la secuencia mostró la existencia de cinco ORFs no superpuestas separadas por regiones intergénicas no codificantes: la ORF1 que codifica una proteína de 292 aa (pI/p32) con una masa molecular de 31,8 kDa; la ORF2 que codifica una proteína de 415 aa (pII/p47) con una masa molecular de 46,9 kDa; la ORF3 que codifica una proteína de 148 aa (pIII/p17) con una masa molecular de 17 kDa; la ORF4 que codifica una proteína de 202 aa (pIV/p22) con una masa molecular de 22,1 kDa; y la ORF5 que codifica una proteína de 256 aa (pV/p30) con una masa molecular de 29,6 kDa. Las ORF3, 4 y 5 se encuentran en el marco de lectura +2, mientras que la ORF1 y la ORF2 están ubicados en los marcos de lectura +1 y +3, respectivamente.

El análisis BLASTP de cada proteína codificada en el *contig* C-II, mostró que solo la proteína pII presentaba similitudes con proteínas de la base de datos *on-line* del NCBI. Concretamente la proteína pII mostró una identidad de aminoácidos del 39,18% (con cobertura del 87%) con la nucleoproteína (NP) del virus *magnaporthe oryzae mymonavirus 1* (QVU39969), un virus que pertenece a la familia *Mymonaviridae*, orden *Mononegavirales*.

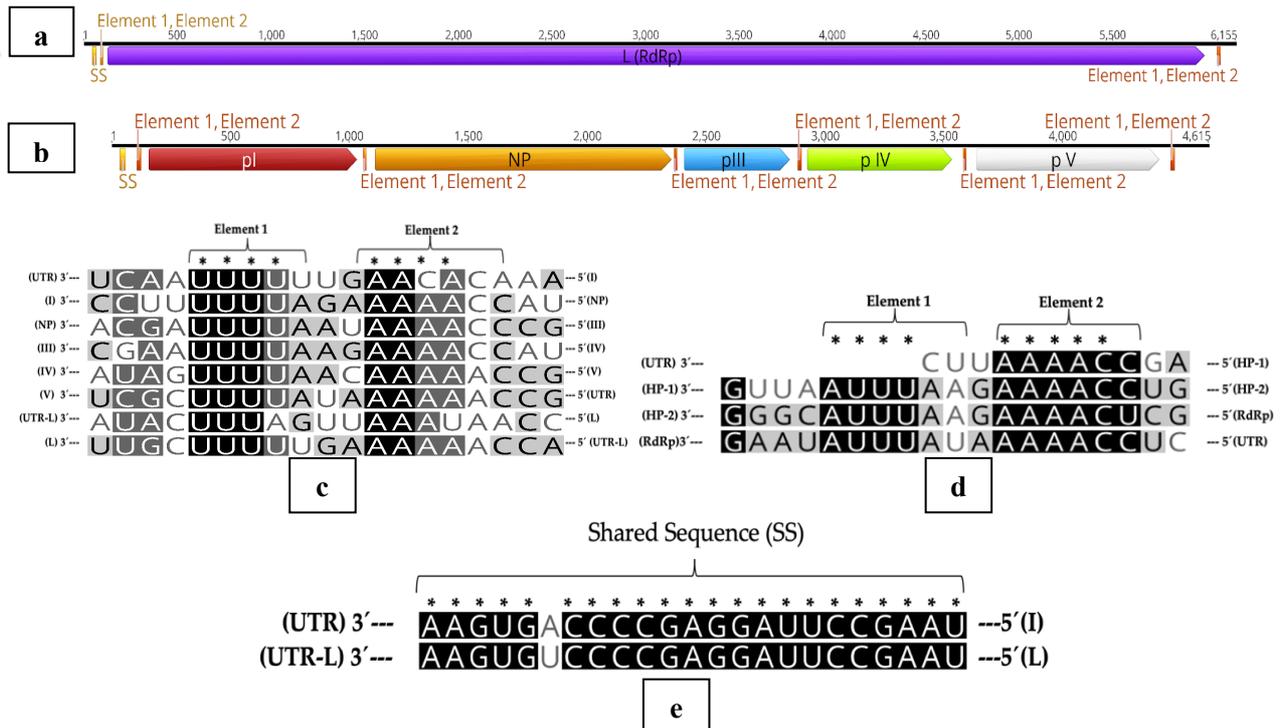
Adicionalmente, en el contig C-II se encontraron regiones intergénicas no codificantes (IGR), ricas en nucleótidos A/U muy similares a las regiones intergénicas de otros virus pertenecientes al orden *Mononegavirales*. De igual forma, en el C-I se encontraron secuencias ricas en A/U, similares a las IGR del C-II, en los extremos 3'UTR y UTR 5' de la proteína RdRp.

El alineamiento de las secuencias de las regiones IGR del *contig* C-II y las secuencias ricas en A/U localizadas en los extremos del *contig* C-I mostró la presencia de dos posibles regiones o elementos conservados ricos en repeticiones de nucleótidos U y A separados por dos nucleótidos (Figura 38a). En este estudio hemos denominado a estas posibles regiones conservadas como elementos 1 y 2. Curiosamente un alineamiento similar realizado con las secuencias IGR del mymonavirus de artrópodo HbRLV-4 (NC\_032783) mostró la existencia de estos posibles elementos conservados (Figura 38b).

Además de la presencia de los elementos 1 y 2 en C-II, se encontró otra similitud entre los *contigs* C-I y C-II, concretamente una secuencia compartida (*shared sequence, SS*) de veintitrés nucleótidos con un solo polimorfismo de un nucleótido (Figura 38e), sugiriendo nuevamente la relación genómica entre ambos ARNs recuperados (C-I y C-II). La confirmación del ensamblado de los *contigs* C-I y C-II se realizó mediante RT-PCR y secuenciación Sanger, utilizando cebadores diseñados específicamente en base a las secuencias recuperadas por HTS. Las secuencias obtenidas para todos los productos de RT-PCR amplificados confirmaron las secuencias ensambladas *de novo* en el análisis HTS.



## Resultados y discusión



**Figura 38.** **a.** Contig I (6.155 nt) el cual codifica una proteína RdRp de 1.952 aa; **b.** Contig II (4.615 nt), el cual codifica 5 proteínas (pI a pV); **c.** alineamiento de secuencias de las regiones intergénicas identificadas en los *contigs* C-I y C-II; **d.** alineamiento de secuencias de las regiones intergénicas (IGR) del hubei rhabdo-like virus 4 strain arthropodmix 13990 (NC\_032783); **e.** alineamiento de las secuencias compartidas (SS) entre los *contigs* C-I y C-II.

Un análisis posterior mediante BLASTN contra la base de datos *on-line* realizado en el año 2020 y 2021, desveló que el *contig* C-I tenía una identidad nucleotídica del 99,82% y 99,85 (con una cobertura del 99-100%) con el gen de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) de dos virus recientemente descritos, *Erysiphe necator associated negative-stranded RNA virus 2*, y *Plasmopara viticola lesion associated mononegaambi virus 3* (PvaMV-3) (*Penicillimonavirus gammaplasmopara* según Kuhn *et al.*, 2021) correspondiente a los aislados PMS5\_DN69581 (MN617061.1) y DMG-C\_DN30838 (MN556998) respectivamente (Tabla 14a).

El análisis BLASTP de la proteína de 1952 aa codificada en la ORF presente en el *contig* C-I (RdRp), mostró identidades de aminoácidos del 99,89% y 99,84% (con coberturas del 99-100% respectivamente) con las proteínas RdRp de los mismos aislados virales antes mencionados (QJW70363.1-QHD64773.1) (Tabla 14b).

Curiosamente las secuencias nucleotídicas MN617061.1 y MN556998 y las aminoacídicas QJW70363.1 y QHD64773.1 de las dos especies virales *Erysiphe necator associated negative-stranded RNA virus 2* y *P. gammaplasmopara* son un 99,9% idénticas entre ellas.

		MN556998	MN617061	C-I
a	MN556998		99.93499%	99.82117%
	MN617061	99.93499%		99.85378%
	C-I	99.82117%	99.85378%	
b	QHD64773.1		99.94877%	99.84631%
	QJW70363.1	99.94877%		99.89754%
	L-RdRp	99.84631%	99.89754%	

**Tabla 14.** a. Matrices de identidad (expresada en porcentajes) comparando las secuencias nucleotídicas (a) y aminoacídicas (b) de los virus *Erysiphe necator associated negative-stranded RNA virus 2* (MN617061.1 y QJW70363.1) y *Plasmopara viticola lesion associated mononegambi virus 3* aislado DMG-C\_DN30838 (MN556998) (QHD64773.1) y el contig C-I recuperado en este estudio.

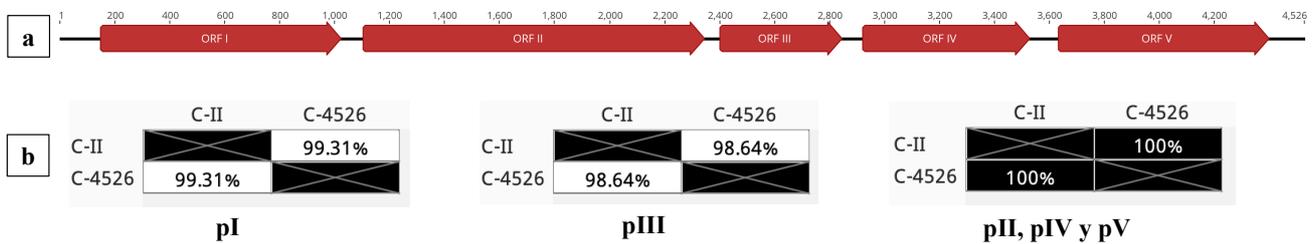
Dado que el *contig* C-I mostró una alta identidad de nucleótidos con el aislado DMG-C de la especie *Penicillimonavirus gammaplasmopara* y que la *BioSample* en que se identificó este virus está disponible en la base de datos *Sequence Read Archive* del NCBI, se procedió a reanalizar los datos crudos de HTS de dicha *BioSample* para intentar recuperar el C-II ensamblado en este estudio. Tanto el ensamblaje *de novo* como los resultados de mapeo obtenidos de 124.744.372 *reads* incluidas en la *BioSample* (SAMN14402113) mostraron la presencia de un *contig* casi idéntico a C-II. De hecho, se recuperó un *contig*, denominado C-4526 por su tamaño de 4526 nt, que presentó una identidad del 99,73% con la secuencia del *contig* C-II.

Además, la búsqueda de ORFs realizada en el C-4526 mostró también la presencia de cinco ORFs no superpuestas, separados por regiones intergénicas no codificantes idénticas a las del *contig* C-II (Figura 38a).



## Resultados y discusión

La comparación entre las ORFs de los *contigs* C-II y C-4526, realizada por alineación de aminoácidos, mostró una identidad del 100% en las ORF2, 4 y 5; mientras que las ORF1 y 3 mostraron una identidad del 99,3% y 98,6% respectivamente (Figura 39b). También se encontraron en las regiones intergénicas no codificantes del *contig* C-4526 los elementos 1 y 2 con una identidad de secuencia del 100%, sugiriendo que ambos *contigs* corresponden a la misma especie viral. Además de las regiones intergénicas conservadas, en el C-4526 también se identificó la región SS, la cual presentó una pequeña diferencia de 2 nt respecto a la SS del C-I (Figura 43).



**Figura 39.** a. Organización de pautas de lectura abierta (ORFs) que se encuentran en el *contig* C-4526; b. Comparación de matrices de identidad (expresada en porcentajes) entre las proteínas codificadas en C-II (descrito en este estudio) y las presentes en C-4526 (ensamblado *de novo* a partir de la *BioSample* SAMN14402113 (SRR11364892)).

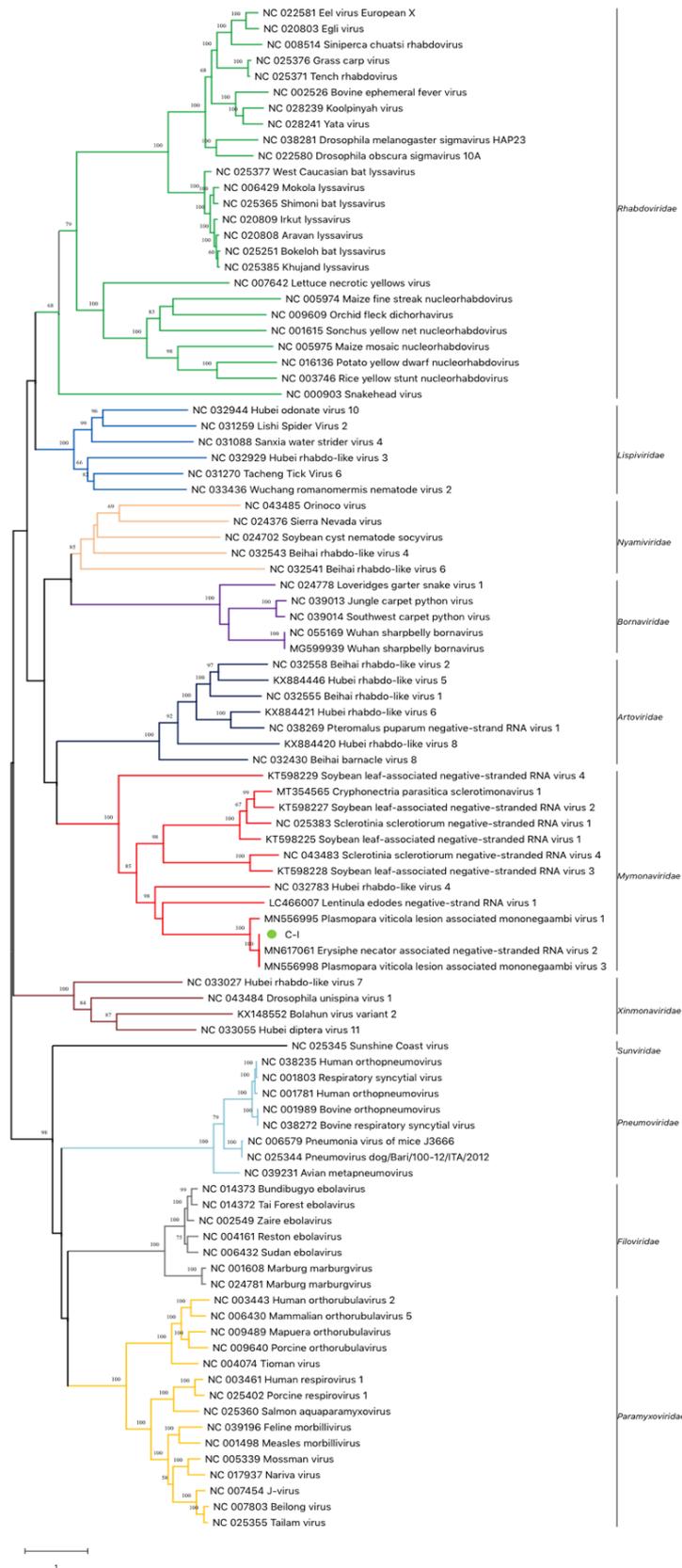
### 4.5.1.2 Análisis filogenético de *Penicillimonavirus gammaplasmapara* y la secuencia C-II

Se estudió la relación filogenética entre los virus que componen el orden *Mononegavirales* y las secuencias C-I y C-II. Para ello, se realizó un análisis en el que se seleccionaron las regiones codificantes correspondientes a dos de las proteínas identificadas que desempeñan un importante papel evolutivo y tienen un elevado criterio taxonómico: la ARN polimerasa dependiente de ARN codificada en C-I (RdRp), y la nucleoproteína codificada en la ORF 2 de C-II (NP).

Para el análisis filogenético de la proteína RdRp, se seleccionaron 95 secuencias aminoacídicas correspondientes a 11 familias virales del grupo de los virus de RNA de hebra negativa: *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Pneumoviridae*, *Sunviridae*, *Xinmonaviridae*, *Myxmonaviridae*, *Artoviridae*, *Bornaviridae*, *Nyamiviridae*, *Lispiviridae*

y *Rhabdoviridae*. El árbol filogenético, basado en las secuencias de la proteína RdRp (Figura 40), mostró que las diferentes familias, géneros y especies se agrupaban con valores sólidos *bootstrap* que oscilan entre el 68 y el 100%. A su vez, se observa que la proteína codificada en el contig C-I agrupa dentro del género *Mymonaviridae*; junto con las especies *Plasmopara viticola lesion associated mononegaambi virus 1* y en el mismo clado compuesto por las especies *Erysiphe necator associated negative-stranded RNA virus 2* y *Penicillimonavirus gammaplasmopara*, soportado por un valor de *bootstrap* de 100%, sugiriendo que las tres secuencias corresponden al nuevo género *Penicillimonavirus*, propuesto recientemente por Kuhn *et al.*, (2021).





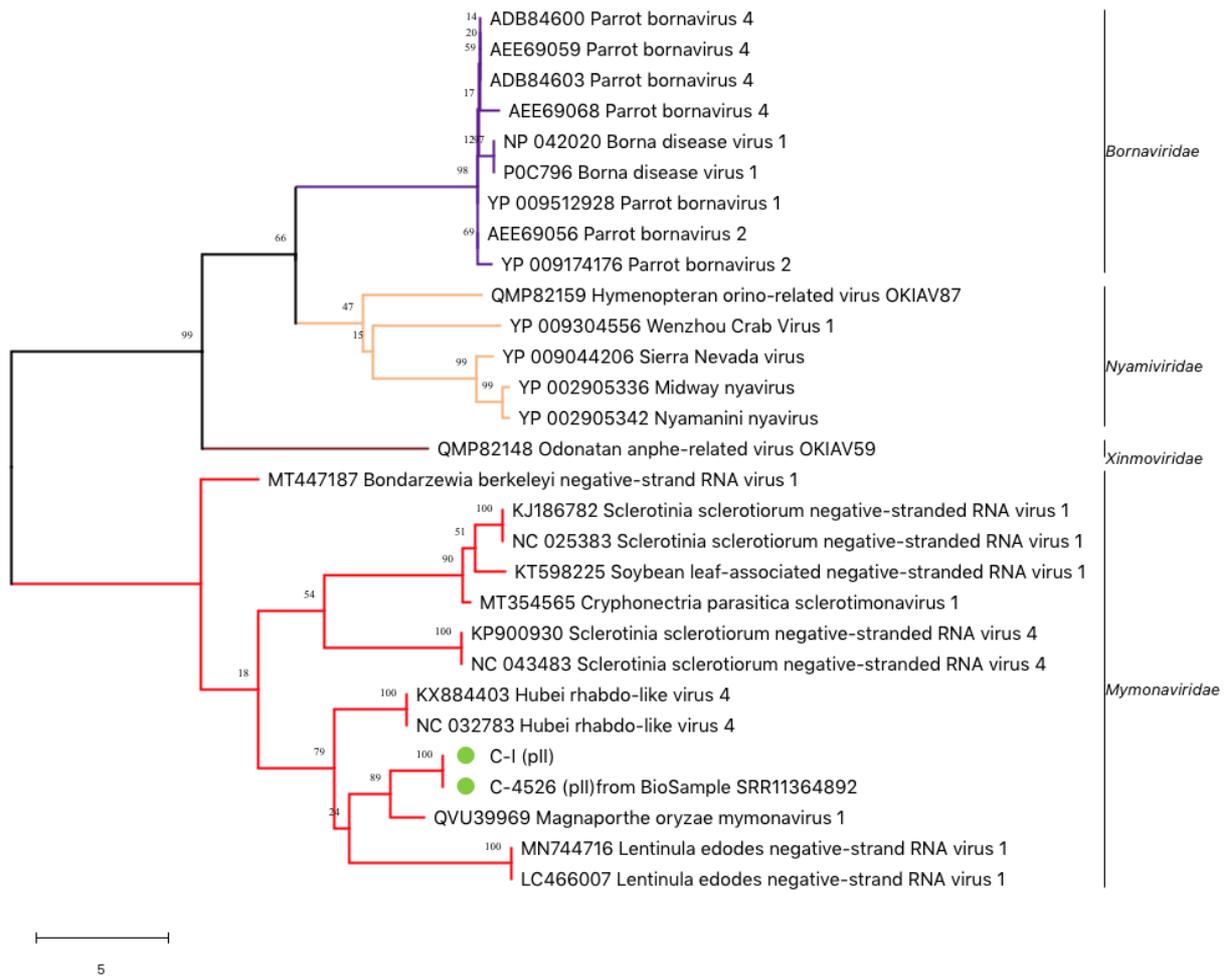
**Figura 40.** Análisis filogenético de 95 secuencias aminoacídicas de la proteína RdRp correspondiente a 11 familias representativas del orden *Mononegavirales*; empleando el método máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) y utilizando el mejor modelo de sustitución Le-Gascuel (LG). La prueba de *bootstrap* se realizó con 1000 réplicas y se muestran valores mayores a 75.

Por otro lado, se realizó un estudio filogenético en base a diferentes secuencias aminoacídicas de NP pertenecientes a las familias *Mymonaviridae*, *Xinmonaviridae*, *Nyamiviridae* y *Bornaviridae*. En estos árboles filogenéticos (Figura 41) se puede apreciar que las diferentes familias seleccionadas para el análisis (*Mymonaviridae*, *Xinmonaviridae*, *Nyamiviridae* y *Bornaviridae*) se agrupan con valores de *bootstrap* que oscilan entre el 66-99%. En el caso de las especies que componen la familia *Mymonaviridae*, se aprecian diferentes agrupaciones acordes a los géneros *Sclerotimonavirus*, *Phyllomonavirus*, *Hubramonavirus* y *Lentimonavirus*, con valores de *bootstrap* de 54-100%. En el caso de la proteína NP, codificada tanto en el C-II como C-4526, se puede apreciar que agrupan dentro de la familia *Mymonaviridae*, al igual que ocurrió en el análisis filogenético de las proteínas RdRp del C-I. A su vez las proteínas NP, se distinguen del resto de los géneros que componen la familia *Mymonaviridae*, agrupando en un *cluster* que podría corresponder al género *Penicillimonavirus* anteriormente mencionado (Kuhn *et al.*, 2021).

Por tanto, los análisis filogenéticos realizados en base a las secuencias aminoacídicas de las proteínas RdRp y NP muestran la existencia de una relación filogenética entre el *contig* C-I y *penicillimonavirus* *gammaplasmopara*, que agrupan dentro del género *Penicillimonavirus*. Y de igual forma el C-II y el C-4526 tienen una relación filogenética y agrupan dentro de un clado en el que podría localizarse el mismo género.

Estos resultados apoyan una relación entre las secuencias C-I y C-II, sugiriendo que podrían tratarse de los segmentos genómicos del virus *penicillimonavirus* *gammaplasmopara*, género *Penicillimonavirus*, familia *Mymonaviridae*





**Figura 41** Análisis filogenético de 29 secuencias aminoacídicas correspondientes a diferentes nucleoproteínas (NP) correspondiente a las familias *Bornaviridae*, *Nyamiviridae*, *Xinmoviridae* y *Mymonaviridae* del orden *Mononegavirales* y a proteínas pII detectadas en este estudio (marcadas con un círculo verde). Se empleó el método máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) y utilizando el mejor modelo de sustitución Le-Gascuel (LG). La prueba de *bootstrap* se realizó con 1000 réplicas y se muestran valores mayores a 75.

#### 4.5.1.3 Presencia del contig C-II en otras *BioSamples* infectadas con *Plasmopara viticola* lesion associated mononegambi virus 3 (*Penicillimonavirus gammaplasmopara*)

La detección y descripción de una secuencia parcial, codificante de la proteína RdRp, de *penicillimonavirus gammaplasmopara* se realizó recientemente enmarcada dentro del *BioProject* PRJNA613358 (Chiapello *et al.*, 2020). Dado que se dispone en la base de datos del NCBI los datos crudos de HTS de las *BioSamples* que componen el proyecto, y que el C-I encontrado en este estudio comparte un 99,82% de identidad nucleotídicas con *penicillimonavirus gammaplasmopara*, se decidió realizar un análisis bioinformático en todas aquellas *BioSamples* en donde estaba presente *penicillimonavirus gammaplasmopara* en busca de la presencia de secuencias similares a C-II. Todo ello con la finalidad de comprobar si ambas secuencias están asociadas.

Se analizaron, mediante análisis BLASTN, ensamblados *de novo* y mapeos contra secuencias de referencia (véase 3.4.2), los dieciséis experimentos de SRA que componen el *BioProject*. Los resultados mostraron la presencia de C-II en cinco *BioSamples*, DMG-C, DMG-G, DMG-E, DMG-D y DMG-B, coincidiendo con aquellas *BioSamples* donde estaba presente PvaMV-3 (Chiapello *et al.*, 2020). El tamaño de los *contigs* recuperados fue de 4526 nt, 4486 nt, 4527 nt, 4428 nt y 4430 nt de las *BioSamples* DMG-C, DMG-B, DMG-D, DMG-E y DMG-G respectivamente. La similitud entre las secuencias recuperadas de cada una de las *BioSamples* (C-II de DMG-C, DMG-B, DMG-D, DMG-E y DMG-G) y el C-II identificado en este estudio mostró una alta cobertura (96-98,1%) y una alta identidad entre las *reads* mapeadas (98,4-100%).

## Resultados y discusión

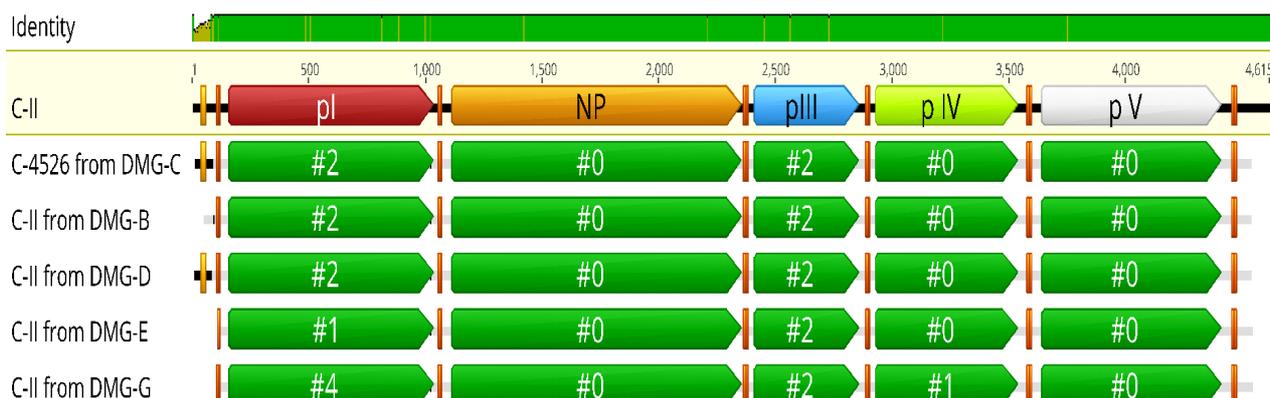
La comparación de identidad de nucleótidos entre los *contigs* recuperados de cada *BioSample* (C-4526 de DMG-C, C-II de DMG-B, DMG-D, DMG-E y DMG-G) mostraron identidades nucleotídicas entre 99,6% y 99,9%, indicando un alto grado de similitud entre ellos (Tabla 15).

**Tabla 15.** Matrices de identidad (expresada en porcentaje) obtenidas comparando las secuencias nucleotídicas del C-II (descrito en este estudio) y los *contigs* relacionados con C-II recuperados

	C-II	C-4526	C-II from DMG-B	C-II from DMG-D	C-II from DMG-E	C-II from DMG-G
C-II		99.7349238%	99.7325011%	99.7128975%	99.9320036%	99.6952596%
C-4526	99.7349238%		99.9777084%	99.9779054%	99.9773088%	99.9435028%
C-II from DMG-B	99.7325011%	99.9777084%		99.9554169%	99.9773088%	99.9435028%
C-II from DMG-D	99.7128975%	99.9779054%	99.9554169%		99.9546177%	99.9209040%
C-II from DMG-E	99.9320036%	99.9773088%	99.9773088%	99.9546177%		99.9206709%
C-II from DMG-G	99.6952596%	99.9435028%	99.9435028%	99.9209040%	99.9206709%	

de las *BioSamples* DMG-C, DMG-G, DMG-E, DMG-D y DMG-B del *BioProject* PRJNA613358.

Por otro lado, al igual que ocurre con el *contig* C-II, las secuencias recuperadas de las cinco *BioSamples* codifican 5 ORFs separadas por secuencias intergénicas no codificantes. Las secuencias de aminoácidos correspondientes a cada una de las cinco proteínas fueron comparadas con las descritas en C-II. Los resultados mostraron una elevada similitud entre todas ellas. Las mayores diferencias se concentran en la proteína pI que contiene entre 1 y 4 aminoácidos diferentes. En la pIII contiene 2 aminoácidos diferentes y en la pIV solo un aminoácido. No se encontraron diferencias en las proteínas NP, pIV y pV (Figura 42).



**Figura 42.** Organización genómica, y comparación aminoacídica con C-II, de los cinco *contigs* recuperados de la base de datos ensamblados a partir del *BioProject*: PRJNA613358. Se indica el número de aminoácidos diferentes de cada ORF respecto a las proteínas codificadas por C-II. Anotaciones en regiones no codificantes en naranja y rojo representan la secuencia SS y los elementos 1 y 2, respectivamente.

Además de encontrarse las 5 ORFs en cada uno de los *contigs* recuperados a partir del *BioProject*, y de presentar un elevado grado de similitud nucleotídica y aminoacídica, también se detectaron las secuencias intergénicas conservadas, denominadas en este estudio como elemento 1 y 2, que fueron idénticos en todos los *contigs* recuperados. Estos resultados apoyan el que podrían tratarse de regiones conservadas, tal y como ocurre en las especies virales correspondientes a la familia *Mymonaviridae*.

Por último, al igual que ocurre con las secuencias C-I y C-II, se detectaron regiones SS en los *contigs* recuperados a partir de las *BioSamples* DMG-C y DMG-D. Estas nuevas secuencias compartidas SS, de 23 nt, son idénticas entre ambos *contigs* recuperados de ambas *BioSamples*, y comparten un 91,3% de similitud con la secuencia MN556998, correspondiente a la proteína RdRp de PvaMV-3 (Chiapello *et al.*, 2020), difiriendo solo en dos nucleótidos (Figura 43).



**Figura 43** Secuencias compartidas (SS) pertenecientes en los extremos 5' de los *contigs* reconstruidos a partir de la *BioSamples* DMG-D (C-II from DMG-D) y de la DMG-C (C-4526) alineados con la región SS de la secuencia de del PvaMV-3 (MN556998) ensamblada a partir de la *BioSamples* DMG-C (Chiapello *et al.*, 2020).

Es destacable mencionar que las regiones SS detectadas en los *contigs* C-II, C-4526 y C-II de DMG-D y la secuencia MN556998 solo presentan una diferencia de dos nt respecto a los *contigs* C-I y C-II descritos en este estudio (Figura 38e). Estos resultados apoyan que esta región está conservada entre los diferentes aislados de *Penicillimonavirus gammaplasmodora* identificados en este estudio.

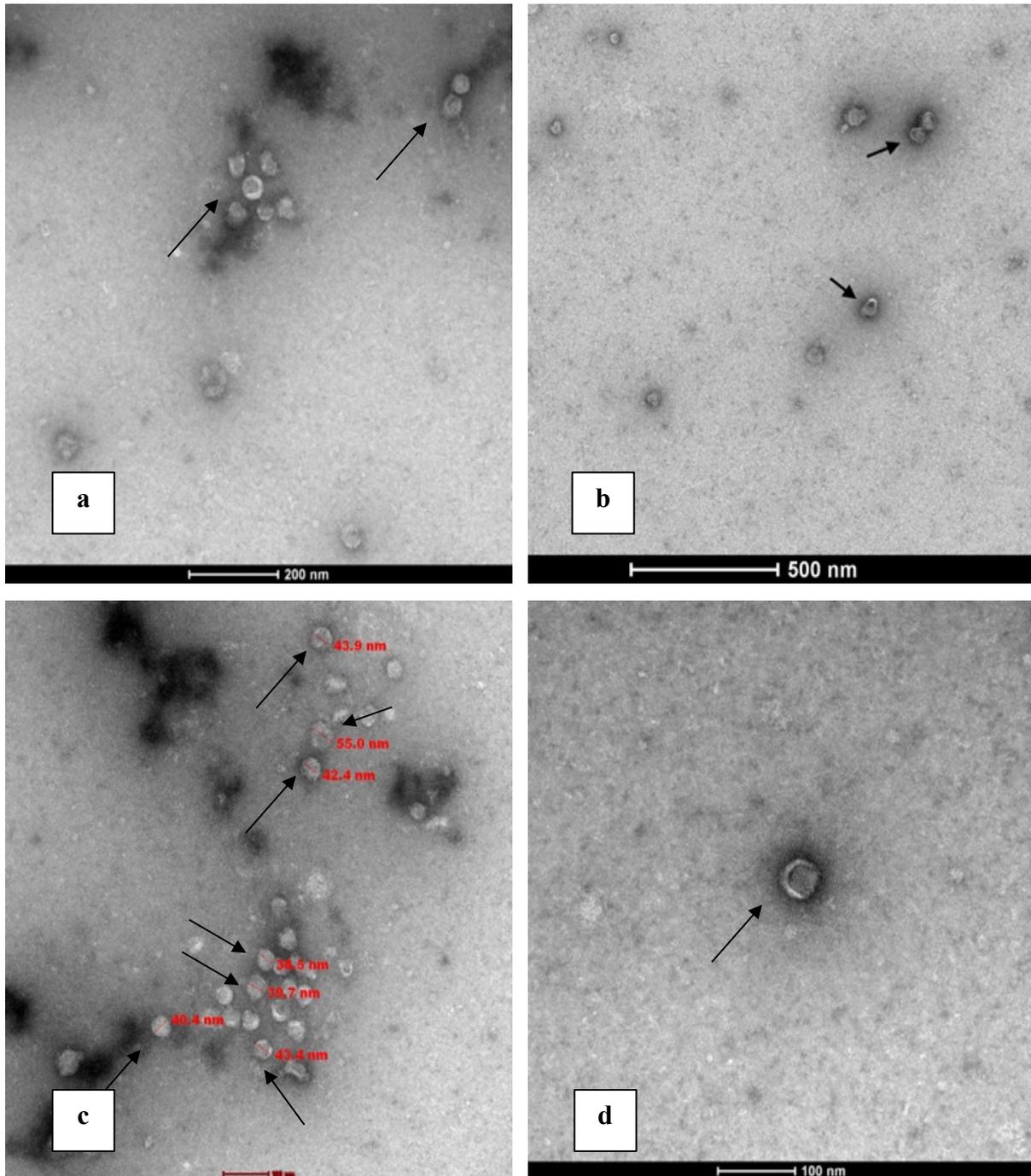
#### 4.5.2 Aislamiento de partículas virales asociadas a *Penicillimonavirus gammaplasmodora*

Con el objetivo de dilucidar el tipo de partícula o partículas virales asociadas a los *contigs* C-I y C-II recuperados y confirmados en este estudio a partir de las muestras sintomáticas analizadas, se procedió a realizar un aislamiento de partículas virales mediante ultra-centrifugación en gradiente de sacarosa. Para ello se utilizó el homogeneizado correspondiente a la planta sintomática 49.3. La detección de la presencia de los *contigs* en cada fracción de sacarosa se realizó mediante RT-PCR, haciendo uso de dos parejas de cebadores empleados para la detección (C-I-1F\_Detection/C-I-554R\_Detection y C-II-6F\_Detection/C-II-580R\_Detection) (Tabla 3).

Los resultados de los análisis de RT-PCR realizados en todas las fracciones mostraron que los *contigs* C-I y C-II estaban siempre presentes en la misma fracción del gradiente de sacarosa aislada; en ningún caso se detectaron en fracciones diferentes.

A partir de la fracción recolectada en la que se había detectado la presencia de ambos *contigs* se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 43). Los resultados fotográficos obtenidos mostraron la presencia de un solo tipo de partícula viral, con una morfología esférica de tamaños que oscilaron entre los 39 y los 55nm. Las partículas virales, detectadas en la fracción positiva para la presencia de los *contigs* C-I y C-II, presentaban en todos los casos un tipo de halo o anillo con menor densidad electrónica. Estos anillos son muy semejantes a los anillos que constituyen las espirales y los monómeros de nucleoproteínas (NP) de los virus pertenecientes a la familia *Myomonaviridae*, sugiriendo que C-I y C-II podrían constituir el genoma de este virus. Mediante TEM no se observó ningún otro tipo de partículas virales diferentes a las anteriormente mencionadas en la región del gradiente en la que se detectaron secuencias específicas de C-I y C-II.





**Figura 44.** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de partículas virales presentes en una fracción del gradiente de sacarosa. Las flechas negras indican la posición de las partículas virales, las barras de escala se muestran en la parte inferior de cada imagen; **a.** grupo de partículas virales de similar morfología; **b.** varias partículas virales donde se aprecian los halos o anillos de menor densidad electrónica; **c.** grupo de partículas virales donde se muestran los tamaños en nanómetros (nm) de cada partícula; **d.** morfología de un único virión.

#### 4.5.4 Asociación de *Penicillimonavirus gammaplasmopara* a hongos patógenos de la vid

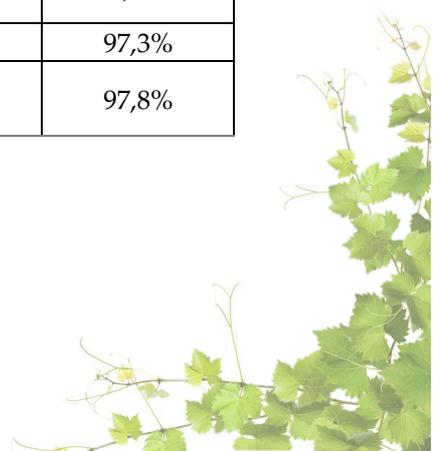
Dado que los resultados de HTS (véase 4.5.1.1 y 4.5.1.2) revelan la presencia de *P. gammaplasmopara* y *Erysiphe necator associated negative-stranded RNA virus 2* en las muestras 49.3 y Pin1 y que ambos micovirus han sido asociados a la presencia de los hongos *Plasmopara viticola* y *Erysiphe necator* (Chiapello *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2018), se procedió a estudiar la presencia de ambos hongos en las dos muestras analizadas mediante HTS. Se realizó un análisis de mapeo de las *reads* de Pin1 y 49.3 (sin sustracción de genoma de planta) (véase 3.4.2 para detalles del mapeo) con el *Geneious Read Mapper Algorithm* contra los genomas de referencia de *P. viticola* y *E. necator* (GCA\_001695595.3 y GCA\_016906895.1, respectivamente).

Este análisis mostró una cobertura máxima de las secuencias del genoma de referencia de *P. viticola* menor al 5,8%. Por el contrario, el mapeo realizado contra el genoma de referencia de *E. necator* mostró una elevada cobertura, superior al 97% del genoma del hongo (Tabla 16). Estos resultados sugieren la ausencia de *P. viticola* y la presencia de *E. necator* en las dos muestras de vid analizadas en este estudio.

**Tabla 16.** Resultados obtenidos del análisis con el algoritmo *Geneious Read Mapper* del mapeo de las *reads* de las dos muestras de vid sintomáticas contra los genomas de referencia de *Plasmopara viticola* (GCA\_001695595.3) y *Erysiphe necator* (GCA\_016906895.1).

Muestra	Número de <i>reads</i> analizadas <sup>1</sup>	Genoma de referencia mapeado (RefSeq)	Número de <i>reads</i> mapeadas	Cobertura máxima contra RefSeq
Pin1	41.826.788	<i>Plasmopara viticola</i> (GCA_001695595.3)	2.567	4,3%
49.3	48.982.950		3.090	5,8%
Pin1	41.826.788	<i>Erysiphe necator</i> (GCA_016906895.1)	356.145	97,3%
49.3	48.982.950		398.428	97,8%

<sup>1</sup> *Reads* sin sustracción de genoma *V. vinifera* L.



Posteriormente, con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos mediante los análisis bioinformáticos, se procedió a evaluar la presencia del hongo *E. necator* mediante PCR, utilizando el protocolo de detección descrito por Falacy *et al.*, (2007), a partir de los ARNs conservados a -80 °C de las muestras Pin1 y 49.3. Los resultados de las PCRs realizadas para ambas muestras fueron positivos, confirmando la presencia del hongo.

### 4.5.5 Discusión

En el presente capítulo se han identificado dos (-)ssRNA detectados en dos plantas de vid (cv. Crimson Seedless) que mostraban una sintomatología particular y característica que consistía en un enrollado hacia el haz de la hoja, a diferencia del síndrome del enrollado de la vid, cuyo enrollado es hacia el envés de la hoja.

Los estudios realizados mediante BLASTN/X y análisis filogenéticos de las secuencias de ambos ARNs sugieren que se trata de dos secuencias relacionadas con el orden de los virus mononegavirales.

Concretamente, los análisis de la secuencia del (-)ssRNA denominado C-I, mostró que esta secuencia está altamente relacionada con los virus *erysiphe necator associated negative-stranded RNA virus 2* y *penicillimonavirus gammaplasmapara 3*, que comparten entre ellos una alta identidad nucleotídica de más del 99%. Estos resultados indican que las tres secuencias, el C-I identificado en este estudio, *erysiphe necator associated negative-stranded RNA virus 2* y *penicillimonavirus ganmaplasmapara 3*, corresponden al genoma de la misma especie viral. Este virus ha sido recientemente identificado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) como *Penicillimonavirus gammaplasmapara*, especie de la familia *Myimonaviridae* (Kuhn *et al.*, 2021).

Por otro lado, los mismos análisis realizados al (-)ssRNA denominado C-II no mostró identidades nucleotídicas significativas con ninguna secuencia depositada en ninguna de las base de datos utilizadas (véase 3.6).

Sin embargo, sí que presentó una organización genómica compatible con la familia *Mymonaviridae*, codificando 5 proteínas (pI a pV), de las cuales una, pII, tenía homología con la nucleoproteína (NP) codificada por la especie *Magnaporthe oryzae mymonavirus 1*.

Los análisis filogenéticos basados en las secuencias de las proteínas RdRp del C-I y la NP del C-II mostraron que en ambos casos estas secuencias se agrupaban en un clado perteneciente a un género de la familia *Mymonaviridae*. La secuencia RdRp de C-I agrupa en el clado de los penicilimonavirus, de acuerdo con la identidad nucleotídica observada entre C-I y las secuencias disponibles en las bases de datos de penicillimonavirus *gammaplasmopara*. Por otro lado, la secuencia NP de C-II, agrupa con la secuencia NP de C-4526 recuperada en este estudio a partir de la *BioSample* en la que se identificó por primera vez el virus *Penicillimonavirus gammaplasmopara*, representando un nuevo *cluster* no asignado a género.

El genoma de la especie *Penicillimonavirus gammaplasmopara* ha sido identificado solo parcialmente, habiéndose recuperado únicamente la secuencia correspondiente a la RdRp. Sin embargo, el genoma de los virus de la familia *Mymonaviridae* se caracteriza por la presencia de seis ORFs no superpuestos separados por regiones intergénicas conservadas. Una posible explicación por la cual no se ha identificado la secuencia completa del genoma de este virus es el hecho de que se trate de un genoma bipartito, en el cual existirían dos segmentos genómicos, un RNA responsable de la codificación de la RdRp y otro RNA conteniendo las ORFs restantes, incluyendo la NP. En este escenario, y dada la escasa homología de secuencia entre las proteínas distintas a la RdRp, la identificación del segundo RNA utilizando herramientas bioinformáticas basadas en comparaciones de secuencias es poco probable.



En el presente estudio se han encontrado una serie de evidencias que apoyan la idea de que las secuencias recuperadas por HTS, C-I y C-II constituyen los dos segmentos del genoma bipartito de penicillimonavirus gammaplasmodora. Las evidencias que apoyan esta hipótesis son que :

- i) La caracterización molecular de C-I y C-II mostró la existencia de regiones intergénicas conservadas (Liu *et al.*, 2014) y una secuencia compartida de veintitrés nucleótidos entre ambos *contigs* (SS).
- ii) El análisis de los datos de HTS correspondientes a las *BioSamples* del estudio de Chiapello *et al.*, (2020), a partir de las cuales se describió la especie *P. gammaplasmodora*, demostró la presencia de la secuencia C-II, descrita en este estudio. En todas estas *BioSamples* analizadas estaban presentes la secuencia C-I (gen RdRp).
- iii) La microscopía electrónica mostró la presencia de un solo tipo de partícula viral, con morfología circular de un tamaño de 39-55nm, las cuales al ser analizadas mediante RT-PCR demostró la presencia de las secuencias correspondientes a los *contigs* C-I y C-II, apoyando la idea de que ambos RNAs están relacionados y conforman un único tipo de virión.

Así pues, los resultados del presente estudio han conseguido caracterizar el posible genoma bipartito completo del virus penicillimonavirus gammaplasmodora. Sin embargo, queda otra cuestión por resolver, que es dilucidar si este posible nuevo virus bipartito de la familia *Myomonaviridae* infecta células de la planta o células fúngicas. En el caso de estudio de la presente tesis, centrado en plantas sintomáticas, ninguna de las secuencias C-I y C-II, se encuentran relacionadas con el hongo *P. viticola*, sin embargo sí que se encuentran asociados con el hongo *E. necator*. De igual forma, las secuencias C-I y C-II también están asociadas a los síntomas atípicos descritos, que no se asocian con los síntomas producidos por *E. necator*.

Curiosamente, la única planta que logró sobrevivir, después del periodo de dormancia, dejó de manifestar síntomas y no se logró detectar de nuevo el virus. Estos datos sugieren la posibilidad de que para que se manifiesten los síntomas debe de estar presente el hongo infectado por este virus bipartito o de que realmente este virus infecte a células de la planta.

Los resultados de esta tesis abren nuevas posibilidades de estudio sobre la taxonomía de la familia *Mymonaviridae* en la que no se había descrito ninguna especie de genoma bipartito hasta la fecha. Además, más experimentos serían necesarios para a dilucidar la asociación entre el virus, el hongo y la planta.





# 6. Conclusiones



-La implementación de las tecnologías HTS, PCR y secuenciación han permitido identificar y caracterizar por primera vez en España el genoma del primer aislado viral de GAMaV, lo cual ha permitido: (i) el diseño de un protocolo de detección que ha demostrado su baja prevalencia en diferentes viñedos españoles; y (ii) el conocimiento de la diversidad genética de los aislados GAMaV españoles que indica que la introducción de este virus en España no es un suceso reciente.

-La evaluación del estado sanitario de los viñedos españoles, realizada durante un periodo de 4 años sobre vides de diferentes orígenes y D.O. ha demostrado que: (i) la prevalencia de los virus comunes de la vid sigue siendo similar a la ya descrita en periodos anteriores; (ii) los virus emergentes GPGV y GAMaV están presentes en España, lo que puede suponer una amenaza para la seguridad sanitaria de los viñedos españoles; y (iii) que otros virus emergentes de relevancia, como son GVE, GVT, GRLDaV, GRBV y GVCV, parecen no estar presentes en las D.O. prospectadas.

-La caracterización de los aislados de GPGV ha demostrado la presencia de un nuevo polimorfismo en su genoma que implica una señal de parada traduccional que determina la síntesis de una proteína de movimiento (MP) cinco aminoácidos más corta. Este nuevo polimorfismo tiene una baja prevalencia en los aislados españoles y no se ha asociado a la sintomatología observada, como ocurre con el polimorfismo previamente descrito.

-El análisis filogenético de los aislados de GRLDaV muestran un alto grado de diversidad genética relacionada con la distribución geográfica del virus la cual puede comprometer la fiabilidad del diagnóstico de este patógeno.

-Las especies de pseudococcidos, *P. citri* y *P. viburni* bajo nuestras condiciones experimentales son capaces de adquirir GRLDaV, poniendo de manifiesto que podrían ser vectores de transmisión del virus.

- Se han desarrollado tres nuevos métodos de detección, uno basado en RT-PCR convencional para la detección de GAMaV y dos basados en PCR en tiempo real para la detección y cuantificación absoluta de GPGV y GRLDaV, siendo este último una alerta EPPPO desde 2018. Los métodos de detección de GPGV y GRLDaV han sido aplicados con éxito para el diagnóstico de los dos virus tanto en plantas de vid como en sus posibles vectores de transmisión.

-Los métodos de detección desarrollados pueden ser aplicados a futuros estudios epidemiológicos y contribuir a la prevención de la dispersión de estos patógenos en España y en otros territorios del mundo.

-Se ha identificado por primera el genoma completo del micovirus penicillimonavirus gammaplasmopara, asociado a una nueva sintomatología de vid de etiología desconocida.

-Los estudios de caracterización molecular y asilamiento de viriones de esta especie viral sugieren que podría tratarse del primer virus bipartito de la familia *Mymonaviridae*.



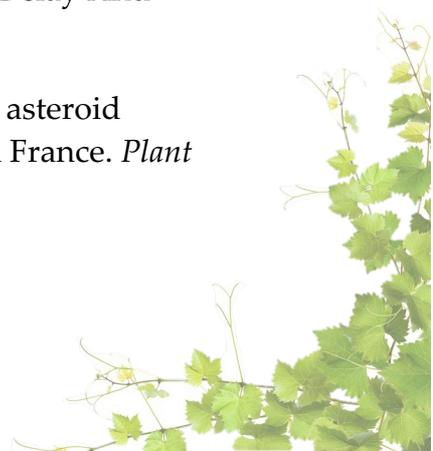


# 7. Bibliografía



- Abe J, Nabeshima T, 2021. First report of grapevine Pinot gris virus in wild grapevines (*Vitis coignetiae*) in Japan. *Journal of Plant Pathology* **103**, 725.
- Adams IP, Glover RH, Monger WA *et al.*, 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* **10**, 537–545.
- Alabi OJ, Poojari S, Sarver K, Martin RR, Naidu RA, 2013. Complete genome sequence analysis of an American isolate of Grapevine virus E. *Virus genes* **46**, 563–566.
- Almeida RP, Daane KM, Bell VA *et al.*, 2013. Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Altman DG, Bland JM, 1994. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: Sensitivity and specificity. *BMJ* **308**, 1552.
- Andret-Link P, Laporte C, Valat L *et al.*, 2004. Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology* **86**, 183–195.
- Andrew MQK, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, 2012. Family - Betaflexiviridae. En King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJBT-VT, eds. San Diego: Elsevier, 920–941.
- Ayllón MA, Cambra M, Llave C, 2018. *Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides*. Sociedad Española de Fitopatología (SEF). Bubok Publishing S.L.
- Barrios Sanroma G, Ramón Coscolla R, Lucas Espada A, Pérez Deobanos JJ, Perez Marin J, Toledo Paños J, 2004. *Los Parásitos De La Vid: Estrategias De Protección Razonada*. S.A. Mundi-Prensa.
- Basso MF, Fajardo TVM, Saldarelli P, 2017. Grapevine virus diseases: economic impact and current advances in viral prospection and management. *Revista Brasileira de Fruticultura* **39**.
- Beach S, Kovens M, Hubbert LA *et al.*, 2017. Genetic and Phenotypic Characterization of Grapevine vein clearing virus from Wild *Vitis rupestris*. *Phytopathology* **107**, 138–144.
- Bertazzon N, Angelini E, Signorotto M, Genov N, 2021. First report of grapevine Pinot gris virus and grapevine leafroll-associated virus 2 in Bulgarian vineyards. *Journal of Plant Diseases and Protection* **128**, 597–599.

- Bertazzon N, Filippin L, Forte V, Angelini E, 2016. Grapevine Pinot gris virus seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy. *Archives of Virology* **161**, 711–714.
- Bertazzon N, Forte V, Angelini E, 2020. Fast transmission of grapevine ‘Pinot gris’ virus (GPGV) in vineyard. *Vitis - Journal of Grapevine Research* **59**, 29–34.
- Bertazzon N, Forte V, Filippin L, Causin R, Maixner M, Angelini E, 2017. Association between genetic variability and titre of Grapevine Pinot gris virus with disease symptoms. *Plant Pathology* **66**, 949–959.
- Bertolini E, García J, Yuste A, Olmos A, 2010. High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* **128**, 283–287.
- Bester R, Lotos L, Vermeulen A, Pietersen G, Maliogka VI, Maree HJ, 2021. Complete genome sequence of a grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV) variant from South Africa. *Archives of Virology* **166**, 2041–2044.
- Beuve M, Candresse T, Tannières M, Lemaire O, 2015. First report of grapevine pinot gris virus (Gpgv) in grapevine in France. *Plant Disease* **99**.
- Bhat AI, Hohn T, Selvarajan R, 2016. Badnaviruses: The current global scenario. *Viruses* **8**, 177.
- Bois B, Zito S, Calon nec A, 2017. Climate vs grapevine pests and diseases worldwide: the first results of a global survey. *OENO One* **51**, 133–139.
- Borges AF, Fonseca C, Ferreira RB, Lourenço AM, Monteiro S, 2014. Reference gene validation for quantitative RT-PCR during biotic and abiotic stresses in *Vitis vinifera*. *PLoS ONE* **9**, e111399.
- Bustin SA, 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**, 169–193.
- Calvi BL, 2011. Effects Of Red-leaf Disease On Cabernet Sauvignon At The Oakville Experimental Vineyard And Mitigation By Harvest Delay And Crop Adjustment. University of California.
- Candresse T, Faure C, Theil S *et al.*, 2017. First report of grapevine asteroid mosaic-associated virus infecting grapevine (*Vitis vinifera*) in France. *Plant Disease* **101**, 1061.



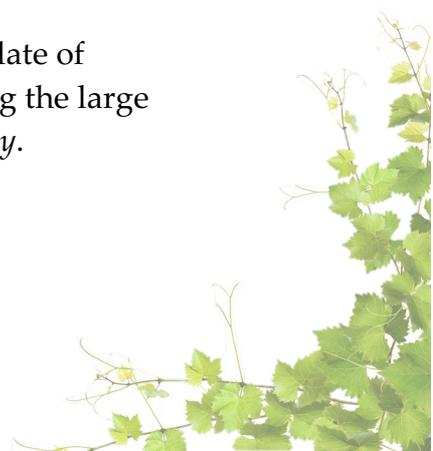
- Cantó T, Aranda MA, Fereres A, 2009. Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Global Change Biology* **15**, 1884–1894.
- Chiaki Y, Ito T, 2021. Virome analysis of genetic resources of grapevine. *Unpublished*.
- Chiapello M, Rodríguez-Romero J, Ayllón MA, Turina M, 2020. Analysis of the virome associated to grapevine downy mildew lesions reveals new mycovirus lineages. *Virus Evolution* **6**.
- Chiumenti M, Morelli M, Giampetruzzi A *et al.*, 2015. First report of grapevine roditis leaf discoloration-associated virus in Italy. *Journal of Plant Pathology* **97**, 551.
- Coetzee B, Maree HJ, Stephan D, Freeborough MJ, Burger JT, 2010. The first complete nucleotide sequence of a grapevine virus E variant. *Archives of virology* **155**, 1357–1360.
- Debat H, Luna F, Moyano S, Zavallo D, Asurmendi S, Gomez-Talquenca S, 2020. First report of grapevine Pinot gris virus infecting grapevine in Argentina. *Journal of Plant Pathology* **102**, 1321.
- Diaz-Lara A, Erickson TM, Golino D, Rwahnih M Al, 2020. Development of a universal RT-PCR assay for grapevine vitiviruses. *PLOS ONE* **15**, e0239522.
- Dolja V V., Meng B, Martelli GP, 2017. Evolutionary aspects of grapevine virology. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing, 659–688.
- Duffus JE, 1977. Aphids, viruses, and the yellow plague. In: *Aphids As Virus Vectors*. Elsevier, 361–383.
- Eichmeier A, Penazova E, Nebish A, 2020. First report of Grapevine Pinot gris Virus on Grapevines in Armenia. *Plant Disease* **104**.
- Elbeaino T, 2019. BioProject Grapevine vitiviruses (ID 575389).
- Elbeaino T, Chammem H, Alsaheli Z, Ben Slimen A, Digiaro M, 2019. Development of RT-PCR assays for the detection and the resultant phylogenetic analysis of four grapevine vitiviruses based on the coat protein sequences. *Journal of Virological Methods* **273**, 113712.
- EPPO Arabis mosaic virus | EPPO Global Database. Accesible en <https://gd.eppo.int/>

- EPPO Grapevine red blotch virus | EPPO Global Database. Accesible en <https://gd.eppo.int/>
- EPPO, 2008. PM4/008 Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. *EPPO Bulletin* **38**, 422–429.
- EPPO, 2018a. EPPO alert list-Grapevine Roditis leaf discoloration associated virus. Accesible en <https://eppo.int/>
- EPPO, 2018b. PM 7/76 (5) Use of EPPO Diagnostic Standards. *EPPO Bulletin* **48**, 373–377.
- EPPO, 2019. PM 7/98 (4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin* **49**, 530–563.
- EPPO, 2021. Introduction to PM 7 Standards on Diagnostics. *EPPO Bulletin* **51**, 455–456.
- Ertunc F, 2019. Emerging plant viruses. In: *Emerging and Reemerging Viral Pathogens: Volume 1: Fundamental and Basic Virology Aspects of Human, Animal and Plant Pathogens*. Academic Press, 1041–1062.
- Fajardo TVM, Eiras M, Nickel O, 2017. First report of Grapevine Pinot gris virus infecting grapevine in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* **12**, 1–4.
- Falacy JS, Grove GG, Mahaffee WF *et al.*, 2007. Detection of Erysiphe necator in Air Samples Using the Polymerase Chain Reaction and Species-Specific Primers. *Phytopathology* **97**, 1290–1297.
- Fan XD, Dong YF, Zhang ZP, Ren F, Hu GJ, Zhu HJ, 2013. First report of Grapevine virus E from grapevines in china. *Journal of Plant Pathology* **95**, 661.
- Fan X, Li C, Zhang Z *et al.*, 2021a. Identification and Characterization of a Novel Emaravirus From Grapevine Showing Chlorotic Mottling Symptoms. *Frontiers in Microbiology* **12**, 1437.
- Fan X, Zhang Z, Li C *et al.*, 2021b. High-throughput sequencing indicates a novel marafivirus in grapevine showing vein-clearing symptoms. *Plants* **10**, 1487.



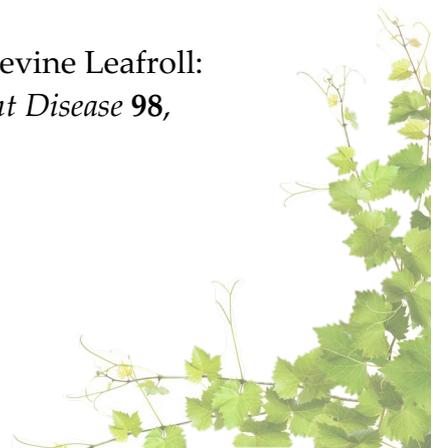
- Fiore N, Zamorano A, Sánchez-Diana N, González X, Pallás V, Sánchez-Navarro J, 2016. First detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus and Grapevine rupestris vein feathering virus, and new phylogenetic groups for Grapevine fleck virus and Hop stunt viroid isolates, revealed from grapevine field surveys in Spain. *Phytopathologia Mediterranea* **55**, 225–238.
- Fuchs M, 2020. Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *Journal of Plant Pathology* **102**, 643–653.
- Gasparro M, Caputo AR, Forleo LR *et al.*, 2016. Study of main grapevine viruses transmission in breeding programs. In: *39 World Congress of Vine and Wine*. Bento Gonçalves, Brazil,.
- Gasperin-Bulbarela J, Licea-Navarro AF, Pino-Villar C, Hernández-Martínez R, Carrillo-Tripp J, 2018. First Report of Grapevine Red Blotch Virus in Mexico. *Phytopathology* **103**, 381.
- Gallardo A., Ocete R., Ferragut F., and López M.A. 2004. Estudio de la infestación causada por el ácaro de la erinosis, *Colomerus vitis* (Pagenstecher) (Acari, Eriophyidae) en poblaciones andaluzas de vid silvestre (*Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi). Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas. **30**:339–346.
- Georgiev V, Ananga A, Tsoleva V, 2014. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients* **6**, 391–415.
- Gergerich RC, Welliver RA, Gettys S *et al.*, 2015. Safeguarding fruit crops in the age of agricultural globalization. *Plant Disease* **99**, 176–187.
- Giampetruzzi A, Roumi V, Roberto R *et al.*, 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Research* **163**, 262–268.
- Glasa M, Predajňa L, Komínek P, Nagyová A, Candresse T, Olmos A, 2014. Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Archives of Virology* **159**, 2103–2107.
- Glasa M, Predajňa L, Sihelská N *et al.*, 2018. Grapevine virus T is relatively widespread in Slovakia and Czech Republic and genetically diverse. *Virus Genes* **54**, 737–741.
- Glawe DA, 2008. The Powdery Mildews: A Review of the World's Most

- Familiar (Yet Poorly Known) Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 27–51.
- Goheen A., 1970. *Grape leafroll - Virus disease in small fruits and grapevines*. Berkeley.
- Gualandri V, Asquini E, Bianchedi P *et al.*, 2017. Identification of herbaceous hosts of the Grapevine Pinot gris virus (GPGV). *European Journal of Plant Pathology* **147**, 21–25.
- Hily JM, Candresse T, Garcia S *et al.*, 2018. High-throughput sequencing and the viromic study of grapevine leaves: From the detection of grapevine-infecting viruses to the description of a new environmental Tymovirales member. *Frontiers in Microbiology* **9**, 1782.
- Hily J-M, Poulicard N, Candresse T *et al.*, 2020. Datamining, Genetic Diversity Analyses, and Phylogeographic Reconstructions Redefine the Worldwide Evolutionary History of Grapevine Pinot gris virus and Grapevine berry inner necrosis virus. *Phytobiomes Journal* • 2020 • **4**, 165–177.
- Hull R, 2013. *Plant Virology: Fifth Edition*. Elsevier Inc.
- Illumina, 2016. *Guía de preparación de muestras de RNA total monocatenario TruSeq*.
- International Organisation of Vine and Wine, 2020. *State of the world vitivinicultural sector in 2019*.
- International Organization of Vine and Wine, 2019. *Statistical report on world vitiviniculture*.
- Jo Y, Song MK, Choi H *et al.*, 2017. Genome Sequence of Grapevine Virus T, a Novel Foveavirus Infecting Grapevine. *Genome Announcements* **5**.
- Krenz B, Thompson JR, Fuchs M, Perry KL, 2012. Complete Genome Sequence of a New Circular DNA Virus from Grapevine. *Journal of Virology* **86**, 7715–7715.
- Krenz B, Thompson JR, McLane HL, Fuchs M, Perry KL, 2014. Grapevine red blotch-associated virus Is Widespread in the United States. *Phytopathology* **104**, 1232–1240.
- Kuhn JH, Adkins S, Agwanda BR *et al.*, 2021. 2021 Taxonomic update of phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. *Archives of Virology*.



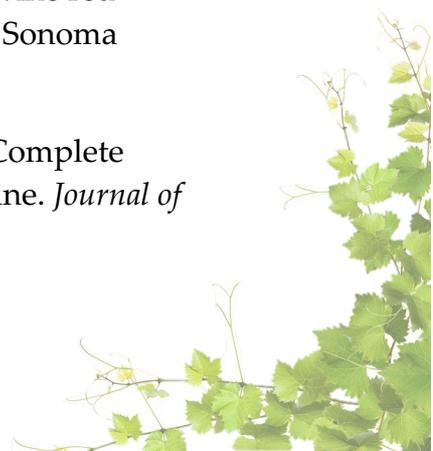
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**, 1547–1549.
- Le SQ, Gascuel O, 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1307–1320.
- Lim S, Igori D, Zhao F, Moon JS, Cho IS, Choi GS, 2016. First Report of Grapevine red blotch-associated virus on Grapevine in Korea. *Phytopathology* **100**, 1957.
- Liu L, Xie J, Cheng J *et al.*, 2014. Fungal negative-stranded RNA virus that is related to bornaviruses and nyaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 12205–12210.
- Llácer G, López M., Trapero A, Bello A (Eds.), 1996. *Patología Vegetal*. Phytoma-España.
- Lloyd G, McCown B, 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture*. **30**, 421–427.
- Luna F, Debat H, Moyano S, Zavallo D, Asurmendi S, Gomez-Talquenca S, 2019. First report of grapevine red blotch virus infecting grapevine in Argentina. *Journal of Plant Pathology* 2019 101:4 **101**, 1239–1239.
- Malagnini V, de Lillo E, Saldarelli P *et al.*, 2016. Transmission of grapevine Pinot gris virus by *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) to grapevine. *Archives of Virology* **161**, 2595–2599.
- Maliogka VI, Olmos A, Pappi PG *et al.*, 2015. A novel grapevine badnavirus is associated with the Roditis leaf discoloration disease. *Virus Research* **203**, 47–55.
- Mannini F, Digiario M, 2017. The effects of viruses and viral diseases on grapes and wine. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer, Cham, 453–482.
- MAPA, 2021a. *Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos en España 2021*.
- MAPA, 2021b. Avance de datos de Viñedo año 2020- Superficies y producciones anuales de cultivos.
- MAPA, 2021c. Producciones agrícolas - Vitivinicultura.

- Martelli GP, 1993. Vein necrosis. In: *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 87–89.
- Martelli GP, 2014. Directory of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine and their Agents. *Journal of Plant Pathology* **96**, 1–4.
- Martelli GP, 2017. An overview on grapevine viruses, viroids, and the diseases they cause. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer, Cham, 31–46.
- Martelli G., Boudon-Padieu E, 2007. *Directory of Infectious Disease of Grapevine*. Bari.
- Martelli GP, Golino DA, Katis NI, 2017. Other grapevine viruses of lesser economic importance. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing, 365–371.
- Marwal A, Kumar R, Paul Khurana SM, Gaur RK, 2019. Complete nucleotide sequence of a new geminivirus isolated from *Vitis vinifera* in India: a symptomless host of Grapevine red blotch virus. *Virusdisease* **30**, 106–111.
- Meng B, Rowhani A, 2017. Grapevine rupestris stem pitting-associated virus. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing, 257–287.
- Molenaar N, Burger JT, Maree HJ, 2015. Detection of a divergent variant of grapevine virus F by next-generation sequencing. *Archives of virology* **160**, 2125–2127.
- Morán F, Canales C, Olmos A, Ruiz-García AB, 2021. First report of grapevine asteroid mosaic associated virus in grapevine in Spain. *Plant Disease* **105**, 517.
- Mordor, 2019. Grapes Market | Growth | Trends | Forecast (2019 - 2024). *Mordor Grapes Industry Report*, 1–98.
- Morelli M, de Moraes Catarino A, Susca L, Saldarelli P, Gualandri V, Martelli GP, 2014. First report of grapevine pinot gris virus from table grapes in southern Italy. *Journal of Plant Pathology* **96**, 439.
- Naidu R, Rowhani A, Fuchs M, Golino D, Martelli GP, 2014. Grapevine Leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant Disease* **98**, 1172–1185.



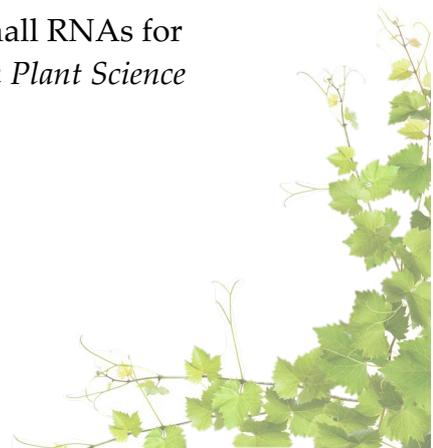
- Nakaune R, Inoue K, Nasu H *et al.*, 2008a. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of Rupestris stem pitting-associated virus. *Journal of General Plant Pathology* **74**, 156–163.
- Nakaune R, Toda S, Mochizuki M, Nakano M, 2008b. Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. *Archives of Virology* **153**, 1827–1832.
- National Center for Biotechnology Information Nucleotide database accesos of NCBI.
- National Center for Biotechnology Information, 2021. Viral Refseq Database - NCBI.
- Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO). 2020. Base de datos FAOSTAT. Accesible en <https://www.fao.org/faostat/>
- Osman F, Leutenegger C, Golino D, Rowhani A, 2007. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1-5 and 9. *Journal of Virological Methods* **141**, 22–29.
- Panailidou P, Lotos L, Olmos A *et al.*, 2019. First report of grapevine virus E and grapevine virus F in grapevine in Greece. *Plant Disease* **103**, 1440.
- Pandey B, Naidu RA, Grove · G G, 2018. Detection and analysis of mycovirus-related RNA viruses from grape powdery mildew fungus *Erysiphe necator*. *Archives of Virology* **163**, 1019–1030.
- Petersen SM, Keith C, Austin K, Howard S, Su L, Qiu W, 2019. A Natural Reservoir and Transmission Vector of Grapevine Vein Clearing Virus. *Plant disease* **103**, 571–577.
- Poojari S, Alabi OJ, Fofanov VY, Naidu RA, 2013. A Leafhopper-Transmissible DNA Virus with Novel Evolutionary Lineage in the Family Geminiviridae Implicated in Grapevine Redleaf Disease by Next-Generation Sequencing. *PLOS ONE* **8**, e64194.
- Poojari S, Lowery DT, Rott M, Schmidt AM, Úrbez-Torres JR, 2017. Incidence, distribution and genetic diversity of Grapevine red blotch virus in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology* **39**, 201–211.
- Porceddu A, Sanna M, Prota VA *et al.*, 2018. First report of grapevine asteroid mosaic-associated virus infecting grapevines (*Vitis vinifera*) in Italy. *Plant Disease* **102**, 2049.

- Qiu W, Schoelz J, 2017. Grapevine vein clearing virus: Diagnostics, genome, genetic diversity, and management. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer, Cham, 315–330.
- Refatti E, Hewitt WB, 1965. Grapevine Asteroid mosaic. In: *Proceedings International Conference on Virus and Vector on Perennial Hosts, with Special Reference to Vitis*. California, 157.
- Rowhani A, Daubert S, Arnold K *et al.*, 2018. Synergy between grapevine vitiviruses and grapevine leafroll viruses. *European Journal of Plant Pathology* **151**, 919–925.
- Rowhani A, Osman F, Daubert SD, Al Rwahnih M, Saldarelli P, 2017a. Polymerase chain reaction methods for the detection of grapevine viruses and viroids. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing, 431–450.
- Rowhani A, Uyemoto JK, Golino DA, Daubert SD, Al Rwahnih M, 2017b. Viruses involved in graft incompatibility and decline. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. 289–302.
- Ruiz-García AB, Okic A, Nourinejhad Zarghani S, Olmos A, Wetzel T, 2018. First Report of Grapevine virus T in Grapevine in Germany. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0161-PDN> **102**, 1675.
- Ruiz-García AB, Olmos A, 2017. First report of grapevine pinot gris virus in grapevine in Spain. *Plant Disease* **101**, 1070.
- Rumbos IC, Avgelis AD, 1989. Roditis Leaf Discoloration - A New Virus Disease of Grapevine: Symptomatology and Transmission to Indicator Plants. *Journal of Phytopathology* **125**, 274–278.
- Al Rwahnih M, Daubert S, Islas C, Golino D, Rowhani A, 2014. Characterization of a fifth vitivirus in Grapevine. *Journal of Plant Pathology* **96**, 219–222.
- Al Rwahnih M, Dave A, Anderson MM *et al.*, 2013. Association of a DNA Virus with Grapevines Affected by Red Blotch Disease in California. *Phytopathology* **103**, 1069.
- Al Rwahnih M, Rowhani A, Golino D, 2015. First Report of Grapevine red blotch-associated virus in Archival Grapevine Material From Sonoma County, California. *Plant Disease* **99**, 895.
- Al Rwahnih M, Sudarshana MR, Uyemoto JK, Rowhani A, 2012. Complete Genome Sequence of a Novel Vitivirus Isolated from Grapevine. *Journal of Virology* **86**, 9545–9545.



- Rwahnih M Al, Alabi OJ, Hwang MS, Tian T, Mollov D, Golino D, 2021. Characterization of a new nepovirus infecting grapevine. *Plant Disease* **105**, PDIS-08-20-1831.
- Rwahnih A, Daubert M, Islas S *et al.*, 2017. First report of Grapevine virus E and Grapevine virus F in Tunisian grapevines. *Journal of Plant Pathology* **99**, 543.
- Sabaghian S, Rakhshandehroo F, El Beaino T, 2019. Study on Population structure and genetic evolutionary of the Grapevine virus F in Iran. *Unpublished*.
- Sabanadzovic S, Abou-Ghanem N, Castellano MA, Digiario M, Martelli GP, 2000. Grapevine fleck virus-like viruses in Vitis. *Archives of Virology* **145**, 553–565.
- Sabanadzovic S, Aboughanem-Sabanadzovic N, Martelli GP, 2017. Grapevine fleck and similar viruses. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing, 331–349.
- Saldarelli P, Giampetruzzi A, Maree HJ, Al Rwahnih M, 2017a. High-throughput sequencing: Advantages beyond virus identification. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing, 625–642.
- Saldarelli P, Giampetruzzi A, Morelli M *et al.*, 2015. Genetic variability of Grapevine Pinot gris virus and its association with Grapevine leaf mottling and deformation. *Phytopathology* **105**, 555–563.
- Saldarelli P, Gualandri V, Malossini U, Glasa M, 2017b. Grapevine pinot gris virus. *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*, 351–363.
- Seguin J, Rajeswaran R, Malpica-López N *et al.*, 2014. De Novo Reconstruction of Consensus Master Genomes of Plant RNA and DNA Viruses from siRNAs. *Plos One* **9**, e88513.
- Selmi I, Lehad A, Pacifico D, Carimi F, Mahfoudhi N, 2017. First report of grapevine virus e and grapevine virus f in Tunisian grapevines. *Journal of Plant Pathology* **99**, 543.
- Setiono FJ, Chatterjee D, Fuchs M, Perry KL, Thompson JR, 2018. The Distribution and Detection of Grapevine red blotch virus in its Host Depend on Time of Sampling and Tissue Type. *Plant disease* **102**, 2187–2193.
- Shi M, Lin XD, Tian JH *et al.*, 2016. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature* **540**, 539–543.

- Sudarshana MR, Perry KL, Fuchs MF, 2015. Grapevine red blotch-associated virus, an emerging threat to the grapevine industry. *Phytopathology* **105**, 1026–1032.
- Tarquini G, Zaina G, Ermacora P *et al.*, 2019. Agroinoculation of grapevine pinot gris virus in tobacco and grapevine provides insights on viral pathogenesis. *PLoS ONE* **14**.
- The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2020. Virus Taxonomy: 2020 Release. *EC 52, Online meeting, October 2020 Email ratification March 2021 (MSL #36)*.
- Thompson JR, Gomez AL, Younas A, González-Tobón J, Cha A, Perry KL, 2021. Grapevine asteroid mosaic-associated virus is resident and prevalent in wild, noncultivated grapevine of new york state. *Plant Disease* **105**, 758–763.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.
- Tokhmechi K, Koolivand D, 2020. First report of grapevine Pinot gris virus infecting grapevine in Iran. *Journal of Plant Pathology* **102**, 549.
- Trebicki P, 2020. Climate change and plant virus epidemiology. *Virus Research* **286**.
- Uhls A, Petersen S, Keith C, Howard S, Bao X, Qiu W, 2021. Grapevine vein clearing virus Is Prevalent and Genetically Variable in Grape Aphid ( *Aphis illinoisensis* Shimer) Populations. *Plant disease* **105**.
- Ulubaş Serçe, Altan B, Bolat V *et al.*, 2018. First report of Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus infecting grapevine (*Vitis vinifera*) in Turkey. *Plant Disease* **102**, 256.
- Vargas-Asencio J, Wojciechowska K, Baskerville M, Gomez AL, Perry KL, Thompson JR, 2017. The complete nucleotide sequence and genomic characterization of grapevine asteroid mosaic associated virus. *Virus Research* **227**, 82–87.
- Velasco L, Padilla C V., 2021. High-Throughput Sequencing of Small RNAs for the Sanitary Certification of Viruses in Grapevine. *Frontiers in Plant Science* **12**, 1469.



- Vončina D, Almeida RPP, 2018. Screening of some Croatian autochthonous grapevine varieties reveals a multitude of viruses, including novel ones. *Archives of Virology* **163**, 2239–2243.
- Wilcox WF, Gubler WD, Uyemoto K, 2015. Diseases of Grape (*Vitis vinifera* L.)- The American Phytopathological Society (APS)-. *The American Phytopathological Society*.
- Woolhouse MEJ, 2002. Population biology of emerging and re-emerging pathogens. *Trends in Microbiology* **10**, 3–7.
- Wright AA, Cross AR, Harper SJ, 2020. A bushel of viruses: Identification of seventeen novel putative viruses by RNA-seq in six apple trees. *PLOS ONE* **15**, e0227669.
- Wu Q, Habili N, 2017. The recent importation of Grapevine Pinot gris virus into Australia. *Virus Genes* **53**, 935–938.
- Xiao H, Shabanian M, Moore C, Li C, Meng B, 2018. Survey for major viruses in commercial *Vitis vinifera* wine grapes in Ontario. *Virology Journal* **15**, 1–11.
- Yang IC, Hafner GJ, Revill PA, Dale JL, Harding RM, 2003. Sequence diversity of South Pacific isolates of Taro bacilliform virus and the development of a PCR-based diagnostic test. *Archives of Virology* **148**, 1957–1968.
- Yang J, Xiao YY, 2013. Grape Phytochemicals and Associated Health Benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**, 1202–1225.
- Yepes LM, Cieniewicz E, Krenz B *et al.*, 2018. Causative Role of Grapevine Red Blotch Virus in Red Blotch Disease. *Phytopathology*.
- Zarghani SN, Hily JM, Glasa M *et al.*, 2018. Grapevine virus T diversity as revealed by full-length genome sequences assembled from high-throughput sequence data. *PLOS ONE* **13**, e0206010.
- Zhang Y, Singh K, Kaur R, Qiu W, 2011. Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. *Phytopathology* **101**, 1081–1090.

## 8. Anexos



## 8.1 Publicaciones asociadas a la presente tesis doctoral

### Disease Notes

#### Diseases Caused by Viruses

##### First Report of Grapevine Asteroid Mosaic Associated Virus in Grapevine in Spain

F. Morán, C. Canales, A. Olmos, and A. B. Ruiz-García<sup>†</sup>

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 46113 Moncada, Valencia, Spain

**Funding:** Funding was provided by Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) grant E-RTA2017-00009. Plant Dis. 105:517, 2021; published online as <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-20-1566-PDN>. Accepted for publication 4 September 2020.

Grapevine asteroid mosaic associated virus (GAMaV) is a member of the genus *Marafivirus*, family *Tymoviridae*. GAMaV was initially found to infect grapevine (*Vitis vinifera*) in California and was also reported in Japan, Canada, Uruguay, France, Hungary, and Italy (Candresse et al. 2017; Nakaune et al. 2008; Porceddu et al. 2018; Vargas-Asencio et al. 2017). In July 2019 a grapevine sample from cultivar Tempranillo (TS1), collected in a random survey from a vineyard in a Spanish grapevine growing area (D.O. Utiel-Requena), showing chlorotic mottling and leaf deformations, was analyzed by high-throughput sequencing (HTS). Total RNA extracted from leaves was sequenced after ribodepletion (Ribo-Zero Plant kit, Illumina) using TrueSeq Illumina technology (150 nt pair-end reads). Data analysis was performed by CLC Genomics Workbench 10.1.1. After quality control and host genome subtraction, 2,410,654 reads were used for de novo assembly. BLAST analysis of the 13,303 contigs obtained revealed the presence of four contigs (2,736, 1,448, 1,285, and 954 nt in size) related to GAMaV, indicating the presence of this virus in TS1 sample. Contigs related to other viruses/viroids were also found, in particular grapevine rupestris stem pitting-associated virus, grapevine leafroll-associated virus 3, grapevine virus A, grapevine fleck virus, grapevine red globe virus, grapevine rupestris vein feathering virus, and hop stunt viroid. For the assembly of the full-length GAMaV genome, contigs were extended by mapping the reads against the contigs using Geneious Prime 2020 software. This mapping step allowed the recovery of the GAMaV genomic sequence (635 reads, average coverage per nucleotide 10.0) with the exception of a small gap of 147 nt in the helicase region of the polyprotein. The gap in the genomic region was covered by

reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using two newly designed primers overlapping the flanking regions (GAMaV-3755-F, 5'-ATCCTCACCAACTCCC-3'; GAMaV-3985-R, 5'-GTTGGAAGTGGTGTG-3'). The nearly complete sequence of the isolate TS1 (6,692 nt, MT459830) showed 87.7% nucleotide identity with the isolate 16GVP031 (MK253012) from France. The phylogenetic analysis performed on the available GAMaV full-length genomes showed that the Spanish isolate was positioned in a distinct clade. The presence of GAMaV in Spain was further evaluated by RT-PCR. Specific GAMaV primers, GAMaV-F3 and GAMaV-R3 previously reported by Candresse et al. (2017), were used without any success, due to primer mismatching. Based on TS1 sequence, two primers (GAMaV-6010F, 5'-CCCTCCTCCTAGCGACGACC-3'; GAMaV-6426R, 5'-GGGTGAGACGGCGGAGATC-3') were designed and used to amplify a fragment of 417 nt in the CP region. Sanger sequencing of the obtained RT-PCR product confirmed the HTS recovered sequence. A total of 52 randomly collected samples from the same grapevine growing area were analyzed by RT-PCR using the newly designed primers. One sample bearing similar symptoms, TS7 (MT770919, cv. Tempranillo), and eight symptomless samples, MS1, MS2, and MS3 (MT770911, MT770917, and MT770918, cv. Macabeo) and TS2, TS3, TS4, TS5, and TS6 (MT770912, MT770913, MT770914, MT770915, and MT770916, cv. Tempranillo), tested positive for GAMaV, thus confirming its presence in Spanish vineyards. The nucleotide identity between these partial sequences and the homologous region of TS1 ranged from 94.7 to 98.8%, 0.04 being the mean diversity among isolates at the CP genomic region estimated by MEGA X software. To our knowledge, this is the first report of GAMaV in grapevine in Spain. The presence of other viruses/viroids in TS1 sample and the finding of asymptomatic GAMaV-infected plants make it difficult to associate this virus to the observed symptomatology. Other latent or semilient GAMaV infections have been previously reported (Candresse et al. 2017; Martelli 2014).

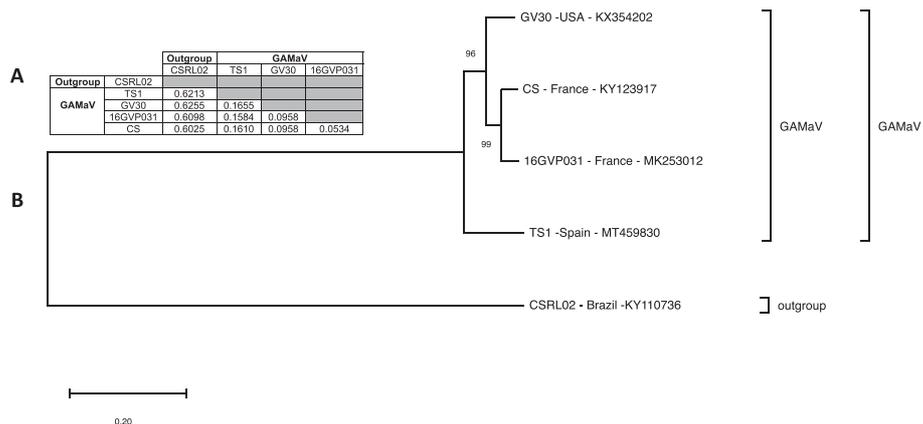
#### References:

- Candresse, T., et al. 2017. Plant Dis. 101:1061.  
 Martelli, G. P. 2014. J. Plant Pathol. 96:1.  
 Nakaune, R., et al. 2008. J. Gen. Plant Pathol. 74:156.  
 Porceddu, A., et al. 2018. Plant Dis. 102:2049.  
 Vargas-Asencio, J., et al. 2017. Virus Res. 227:82.

The author(s) declare no conflict of interest.

e-Xtra

**Keywords:** grapevine, HTS, GAMaV



**Figure S1. A.** Estimates of evolutionary divergence between sequences. The number of base substitutions per site between sequences are shown. Analyses were conducted using the Tamura-Nei model. **B.** Phylogenetic tree constructed with available full-length GAMaV isolates inferred by Maximum Likelihood method and Tamura-Nei model by MEGA X. The isolates are identified by their accession numbers and origin. The scale bar shows a genetic distance of 0.20. Bootstrap percentages (500 re-samplings) are indicated on the branches. Sequence of citrus sudden death-associated virus (KY110736) isolate is used as outgroup reference.

<sup>†</sup>Indicates the corresponding author.  
 E-mail: A. B. Ruiz-García; ana.belen.ruiz@uv.es

## First Report of Grapevine virus E and Grapevine virus F in Grapevine in Greece

**P. Panailidou, L. Lotos**, Laboratory of Plant Pathology, School of Agriculture, Faculty of Agriculture, Forestry and Natural Environment, Aristotle University of Thessaloniki, 54124, Thessaloniki, Greece; **A. Olmos, A.B. Ruiz-Garcia, F. Moran**, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 46113 Moncada, Valencia, Spain; **C.G. Orfanidou, C-L. Sassalou, N.I. Katis and V.I. Maliogka**, Laboratory of Plant Pathology, School of Agriculture, Faculty of Agriculture, Forestry and Natural Environment, Aristotle University of Thessaloniki, 54124, Thessaloniki, Greece

Grapevine virus E (GVE) and grapevine virus F (GVF) are members of the genus *Vitivirus* (family *Betaflexiviridae*) (Nakaune et al., 2008; Al Rwahnih et al., 2012) with a worldwide distribution. Even though grapevine viruses A and B, two other vitiviruses, are prevalent in Greek vineyards, no other member of the genus *Vitivirus* has been reported in Greece so far. In 2017, during a study of the virome of Greek grapevines, one sample (D2.1) from the cultivar Dafnia (Institute of Grapevine, Likovrisi, Attiki) was subjected to high-throughput sequencing (HTS) of total RNA extracted from phloem scrapings using Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation, Canada) on an Illumina NextSeq platform (Lifesequencing, S.L., Spain). The run yielded ~51 million 150 bp paired-end reads. *De novo* assembly of these reads and subsequent BLAST (n/x) analysis of the produced contigs revealed sequences of GVE and GVF, among others. Almost complete genomes from both viruses were reconstructed with 71-98% and 86-89% nucleotide sequence identities to GVE and GVF isolates for which sequences are deposited in databases, respectively. The reconstructed genomes were deposited in GenBank with accession numbers MK490829 for GVE (isolate D2-1/8) and MK490830, MK490831 for GVF (two different GVF variants co-infecting D2.1, namely D2-1/9, D2-1/13). In order to confirm the presence of these two viruses in the D2.1 sample, two sets of primers [GVEup (5'-ATGGAGTCAAAAGCGATCMG-3') and GVEdo (5'-ACCTGTGACTGAGCATCAAATAC-3') and GVF\_F\_4521 (5'-TGTGTGGGCKAARACATA TG-3') and GVF\_R\_5190 (5'-ATCAGAAAAGATGCTMCTCACCT-3')] were used to amplify a 574-bp and a 670-bp fragments from the coat protein and polymerase gene of GVE and GVF, respectively. Sanger sequencing of the amplicons confirmed the presence of both viruses in the analyzed sample. Seventy additional samples from the Institute's collection were screened for the presence of GVE and GVF and the viruses were identified in five and 12 vines, respectively. To our knowledge, this is the first report of GVE and GVF in grapevine in Greece.

This study was partially funded by VirFree. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie grant agreement No 734736. This publication reflects only the authors' view. The Agency is not responsible for any use that may be made of the information it contains. COST Action FA1407 [DIVAS] is also acknowledged.

### References

- Al Rwahnih M., et al., 2012. Journal of Virology 86: 9545. 10.1128/JVI.01444-12
- Nakaune R., et al., 2008. Archives of Virology 153:1827. 10.1007/s00705-008-0188-5



## RESEARCH ARTICLE

# A novel specific duplex real-time RT-PCR method for absolute quantitation of *Grapevine Pinot gris virus* in plant material and single mites

Félix Morán<sup>1</sup>, Antonio Olmos<sup>1</sup>, Leonidas Lotos<sup>2</sup>, Lukáš Predaj a<sup>3</sup>, Nikolaos Katis<sup>2</sup>, Miroslav Glasa<sup>3</sup>, Varvara Maliogka<sup>2</sup>, Ana B. Ruiz-García<sup>1†</sup>

**1** Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia, Spain, **2** Aristotle University of Thessaloniki, Faculty of Agriculture, Forestry and Natural Environment, School of Agriculture, Plant Pathology Laboratory, Thessaloniki, Greece, **3** Institute of Virology, Biomedical Research Centre, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, Bratislava, Slovakia

\* [ana.belen.ruiz@uv.es](mailto:ana.belen.ruiz@uv.es)



 C D 9 B 7 7 9 G G

**Citation:** Morán F, Olmos A, Lotos L, Predaj a L, Katis N, Glasa M, et al. (2018) A novel specific duplex real-time RT-PCR method for absolute quantitation of *Grapevine Pinot gris virus* in plant material and single mites. PLoS ONE 13(5): e0197237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197237>

**Editor:** Andrea Luvisi, Università del Salento, ITALY

**Received:** January 5, 2018

**Accepted:** April 28, 2018

**Published:** May 15, 2018

**Copyright:** © 2018 Morán et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper. All sequences files are available from the GenBank database (accession numbers MH019203, MH019204, MH019205, MH019206, MH019207, MH019208, MH019209, MH019210, MH019211, MH019212, MH019213 and MH019214).

**Funding:** This work was supported by the projects Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) RTA-2014-00061 and INIA E-RTA2017-00009. Also, it has received funding from the

## Abstract

*Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) is a widely distributed grapevine pathogen that has been associated to the grapevine leaf mottling and deformation disease. With the aim of better understanding the disease epidemiology and providing efficient control strategies a specific and quantitative duplex TaqMan real-time RT-PCR assay has been developed. This method has allowed reliable quantitation of the GPGV titer ranging from 30 up to  $3 \times 10^8$  transcript copies, with a detection limit of 70 viral copies in plant material. The assay targets a grapevine internal control that reduces the occurrence of false negative results, thus increasing the diagnostic sensitivity of the technique. Viral isolates both associated and non-associated to symptoms from Greece, Slovakia and Spain have been successfully detected. The method has also been applied to the absolute quantitation of GPGV in its putative transmission vector *Colomerus vitis*. Moreover, the viral titer present in single mites has been determined. In addition, in the current study a new polymorphism in the GPGV genome responsible for a shorter movement protein has been found. A phylogenetic study based on this genomic region has shown a high variability among Spanish isolates and points to a different evolutionary origin of this new polymorphism. The methodology here developed opens new possibilities for basic and epidemiological studies as well as for the establishment of efficient control strategies.

## Introduction

*Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) is a member of the genus *Trichovirus*, family *Betaflexiviridae*. GPGV was described for the first time in Italy as a new trichovirus associated to the grapevine leaf mottling and deformation disease that causes a variety of symptoms, such as chlorotic mottling, puckering and deformations of the leaves, reduced yields and low quality of the

European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 734736. The research was conducted within the framework of COST Action FA1407. LP and MG were also supported by the grant VEGA2/0036/16 from the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education and Slovak Academy of Sciences. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

berries [1]. GPGV genome consists of one molecule of positive single stranded RNA, ranging from 7223 to 7275 nucleotides excluding the 3' polyA tail. The genome contains three overlapping open reading frames (ORFs) and two untranslated regions (UTRs) located at both the 5' and the 3' ends. ORF1 encodes a methyltransferase, a helicase and the RNA dependent RNA polymerase (RdRp), ORF2 encodes the movement protein (MP) and ORF3 encodes the coat protein (CP). Several studies have reported the existence of high variability in GPGV genomes [2–4]. Among this genomic diversity, a polymorphism involving the MP stop codon that produces a six amino acids shorter protein has been described [3]. Although this polymorphism has been related to the symptoms observed in GPGV infected grapevines, a association between this genetic variant and the manifestation of symptoms remains unclear. Phylogenetic studies based on the GPGV MP/CP genomic region have allowed to cluster GPGV isolates in different clades, being some of them generally associated to the presence or absence of symptoms. [3, 4]. In the field, the GPGV-infected grapevines are often simultaneously affected by other viruses, making difficult to attribute a specific etiology to the GPGV infection. In addition, other factors such as viral titer have been reported to play an important role in the development of the disease [4].

GPGV seems to have a high worldwide distribution, as it has been reported infecting grapevine in Italy, Greece, Czech Republic, Slovakia, Slovenia, France, Germany, Portugal, South Korea, China, Canada, USA, Spain, Turkey, Brazil, Croatia, Romania, Ukraine and Australia [5–9]. GPGV has also been shown to infect and induce symptoms in the herbaceous hosts, *Silene latifolia* subsp. *alba* (Mill.) and *Chenopodium album* L. which might represent natural reservoirs of the virus [10]. A potential transmission vector for GPGV has been found, the eriophyid mite *Colomerus vitis*, which has been described to transmit the virus to healthy grapevines [11].

The broad distribution of this pathogen, the existence of potential transmission vectors and reservoirs and the effect of the disease in grape production [1,4] highlight the need for the performance of future studies that give insights into the disease epidemiology and provide efficient control strategies. The main control strategies of plant viral diseases lay on early detection, eradication and use of genetically resistant or tolerant cultivars. In this scenario, the use of specific and reliable detection methods becomes a key factor in the management and control of the diseases. Several detection methods have been developed for the diagnosis of GPGV, based on biological indexing [3] and conventional RT-PCR [2, 12]. Recently, a real-time RT-PCR detection method based on SYBR Green chemistry that allows a relative estimation of the virus titer has been developed by Bertazzon et al. [4]. Quantitative real-time PCR methods have been shown to be powerful tools for viral epidemiological studies and viral detection [13–17]. The aim of this work was the development of a specific real-time RT-PCR detection method able to perform an absolute quantitation of GPGV. This method would represent a powerful tool for GPGV detection and could be applied to future epidemiological studies, allowing the quantitation of the number of viral targets present in plant samples and transmission vectors.

## Materials and methods

### Virus isolates and plant material

Three GPGV isolates from Slovakia (SK30, SK45 and SK704), three isolates from Greece (Tra7, Tra9 and Amb1) and two Spanish isolates (RQ30 and RQ25) were used as positive controls in this study [2,5]. Plant material from three grapevine cultivars sanitized by tip culture was used as negative control. In addition, 178 grapevine samples from a random survey on a Spanish grapevine growing area (D.O. Utiel-Requena) were analyzed. The geographic

coordinates of the two fields of study obtained by Google Maps were 39.47° N 1.18° W (San Antonio) and 39.63° N 1.27° W (Las Cuevas). The survey was conducted on private land, under the permission of the owners.

### RNA isolation

Total RNA from leaf tissue was extracted using the Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canada) following the manufacturer instructions. RNA was quantified with a NanoDropND-100 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) to determine the RNA concentrations and stored at -80°C until subsequent analysis.

### Sequence alignment and primers and probe design

Sequence alignment of 96 GPGV sequences available in the databases (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, accessed on September 2017) was performed using Mega 6 software [18]. Primers were designed on a highly conserved region of the GPGV genome corresponding to the MP/CP genes, GPGV-RT-F ( ) and GPGV-RT-R ( ), yielding an amplicon of 228 bp. A TaqMan ZNA probe, GPGV-genprobe ( ) was designed inside the amplified region. The *Vitis vinifera* house-keeping phosphoenolpyruvate carboxylase gene (*PEP*) was used as an internal control for the real-time RT-PCR reaction [19]. Primers PEP-F1 ( ) and PEP-F2 ( ) were used to amplify a fragment of 196 bp. A TaqMan ZNA probe was designed inside this fragment, PEP-probe ( ).

### Generation of real-time RT-PCR standard curves

A specific nucleotide sequence of the GPGV genome (438bp) containing the sequence targeted by the real-time RT-PCR assay was amplified by RT-PCR using the primers GPGV-6474F ( ) and GPGV-6912R ( ). The amplicon was purified using the mi-PCR Purification Kit (metabion international AG, Martinsried, Germany), inserted in the vector pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, USA) and cloned into *E. coli* HB-101. Transformants were selected by ampicillin resistance and the presence and orientation of the fragment evaluated by sequencing. The plasmid was linearized by restriction with *Sal* I and used as a target in an *in vitro* transcription assay using T7 RNA polymerase (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) followed by DNA digestion by RQ1 RNase-free DNase (Promega Corporation, Madison, USA) at 37°C for 30'. RNA was purified using a Plant/Fungi Total RNA Purification Kit spin column (Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canada) and quantified as mentioned above. The quantitation of the RNA transcripts in picomoles was performed considering the average molecular weight of a ribonucleotide (340 Da) and the number of bases of the transcript ( $N_b$ ). The following mathematical formula was applied:  $\text{pmol of ssRNA} = (\mu\text{g of ssRNA} \times 10^6) / (340 \times N_b)$ . Avogadro constant [20] was used to estimate the number of transcripts ( $6.023 \times 10^{23}$  molecules/mol). Three replicates of ten-fold serial dilutions of the transcripts from  $3 \times 10^8$  to  $3 \times 10^1$  were prepared and used to generate the standard curve. The slope of the calibration curve was used to calculate the amplification efficiency, according to the mathematical formula:  $\text{amplification efficiency} = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$  [21].

### TaqMan quantitative real-time RT-PCR

TaqMan assays for quantitative real-time RT-PCR were carried out in a LightCycler 480, using AgPath-ID One-step RT-PCR kit (Ambion Inc., Austin, TX, USA) and 3  $\mu$ l containing 60 ng of RNA as template. The reaction mixture contained either 150 nM of the probe GPGV-genprobe and 0.9  $\mu$ M of each of the primers GPGV-RT-F and GPGV-RT-R (in a singleplex reaction) or 150 nM of the probe GPGV-genprobe, 50 nM of the probe PEP-probe, 0.9  $\mu$ M of each of the primers GPGV-RT-F and GPGV-RT-R and 0.1  $\mu$ M of each of the primers PEP-F1 and PEP-R1 (in a duplex reaction with the plant internal control). RT-PCR protocol consisted of one step of 45°C for 10 min and 95°C for 10 min followed by 45 cycles of amplification (95°C for 15 s and 60°C for 1 min). Data acquisition and analysis were performed using the LightCycler 1.5 software included in the equipment. The default threshold set by the machine was slightly adjusted above the noise to the linear part of the growth curve at its narrowest point, according to the manufacturer.

### Sensitivity comparison of the TaqMan quantitative real-time RT-PCR with a SYBR Green real-time qPCR

The sensitivity of the TaqMan real-time method developed in this study was compared to a SYBR Green real-time RT-PCR protocol targeting two GPGV genomic regions, the RdRp and the CP [4]. Three replicates of ten-fold serial dilutions of GPGV infected plant extracts with healthy plant extracts were tested by both methods.

### Detection of other grapevine viruses

All the grapevine samples that tested positive for GPGV were analyzed for the presence of the following grapevine viruses: *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Arabis mosaic virus* (ArMV). Detection of these viruses was performed by real time RT-PCR, according to published protocols. GLRaV-1, GLRaV-3, GFkV, GFLV and ArMV presence was analyzed according to Bertolini et al. [22]. Detection of GLRaV-2 was carried out according to Osman et al. [23].

### MP polymorphism of GPGV Spanish isolates

Conventional RT-PCR was used to amplify the 228 bp fragment of the MP/CP genes targeted by the real-time assay in 20 GPGV positive samples using AgPath-ID One-step RT-PCR kit (Ambion Inc., Austin, TX, USA). The reaction mixture contained 0.9  $\mu$ M of each of the primers GPGV-RT-F and GPGV-RT-R and 3  $\mu$ l of RNA. RT-PCR protocol consisted of one step of 45°C for 30 min and 95°C for 10 min followed by 45 cycles of amplification (95°C for 30 s, 50°C for 30 s and 60°C for 1 min). Sanger sequences were aligned using Mega 6 software [18].

### Phylogenetic analysis of GPGV Spanish isolates

A 548 bp fragment of the GPGV MP/CP gene was amplified from 12 GPGV Spanish isolates by conventional RT-PCR using the primers Det-F and Det-R [3,4] under the conditions described above. Sanger sequences were aligned using Mega 6 software [18]. Maximum likelihood tree was obtained using the best nucleotide substitution model (Tamura 3). The sequences included in the phylogenetic analysis were RQ25, RQ30, RQ99, RQ106, RQ108, RQ111, RQ113, RQ115, RQ116, RQ117, RQ125 and RQ136 (GenBank accession numbers MH019203, MH019204, MH019205, MH019206, MH019207, MH019208, MH019209, MH019210, MH019211, MH019212, MH019213 and MH019214, respectively). The following

reference sequences were included in the alignment: MOLA 14, MOLA 6, ALA-P4, ORM-G40, SUS-G49, PIA-G44, SK30 and SK01 (GenBank accession numbers LN606705, LN606703, LN606739, KU845367, KU845372, KU845348, 543887400 and 543887404, respectively).

### Quantitative GPGV detection on *Colomerus vitis*

Leaves with erineae produced by *C. vitis* were collected from GPGV-free grapevines and mites were transferred by contact to GPGV infected leaves. After five days of contact, mites were collected from the infected leaves and deposited on eppendorf tubes. Total RNA was extracted using a Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canada) with slight modifications. Briefly, 100  $\mu$ l of lysis buffer was added to tubes containing 1, 5, 10 or 15 mites. All the assays were performed in duplicates and repeated five times. The suspension was vortexed for 2' in the presence of 212–300  $\mu$ m glass beads (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). After 5' centrifugation at 10000 x g the clarified supernatant was transferred to a fresh tube and the extraction procedure was completed as indicated by the manufacturer. The presence and quantitation of GPGV in *C. vitis* samples was performed as described above, except that a singleplex assay, using only GPGV primers and probe, was performed.

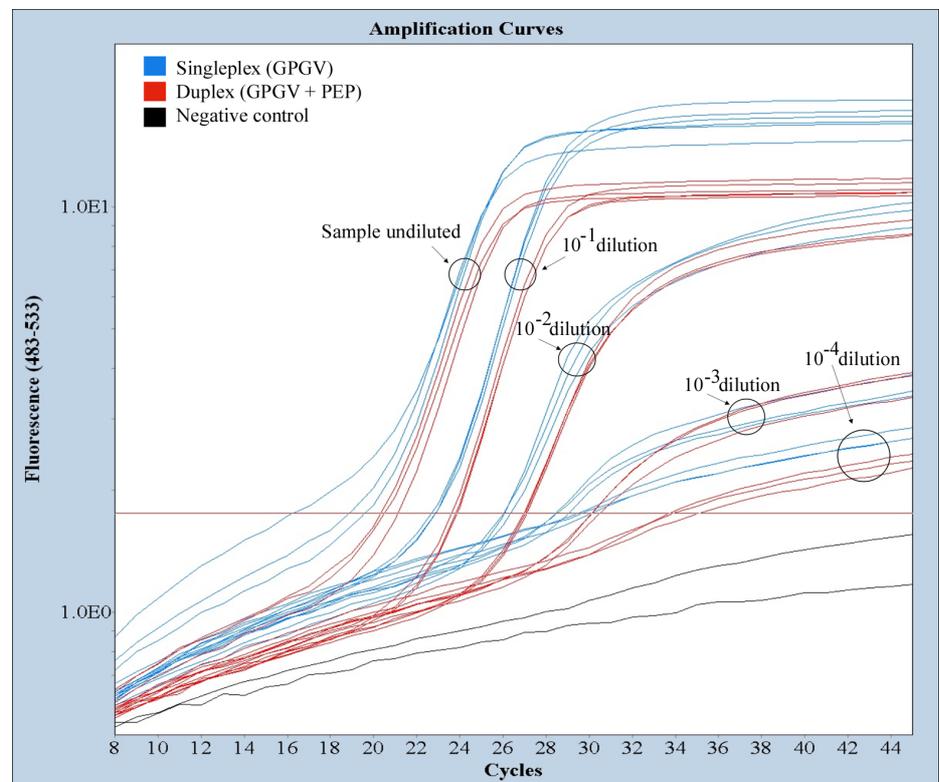
## Results

### Detection of GPGV by real-time RT-PCR

The ability of the real-time RT-PCR method designed in this work to detect GPGV was tested using the positive control from different geographical locations. Two independent replicates of three isolates from Greece (Tra7, Tra9 and Amb1), three isolates from Slovakia (SK30, SK45 and SK704) and two Spanish isolates (RQ30 and RQ25) were analyzed. For all GPGV infected samples a positive detection of the viral sequence was achieved, with a cycle threshold (Ct) values ranging from 24.2 to 30.7. No signal was detected for the three sanitized grapevine cultivars used as negative controls.

### Validation of a plant internal control

In order to decrease the number of putative false negative results, namely positive samples not detected by the method, an internal control of the grapevine *PEP* gene (phosphoenolpyruvate carboxylase) was included in the assay as a duplex RT-PCR reaction. Thus, a negative GPGV detection result is taken into account only if the internal control gives a positive signal. The possible effect of a duplex RT-PCR reaction in GPGV detection technical sensitivity was assessed by the comparison of the signal obtained in a singleplex assay (using only GPGV primers and probe) and the signal obtained in a duplex assay (including the plant internal control primers and probe) in several ten-fold serial dilutions of GPGV infected plant extracts with healthy plant extracts (Fig 1). Three replicates of each dilution were analyzed. The averages of the Ct values obtained and their standard errors were 21.75 $\pm$ 0.22 (undiluted), 24.60 $\pm$ 0.11 ( $10^{-1}$  dilution), 27.99 $\pm$ 0.13 ( $10^{-2}$  dilution), 32.22 $\pm$ 1.44 ( $10^{-3}$  dilution) and 37.68 $\pm$ 0.43 ( $10^{-4}$  dilution), for the singleplex assay, and 22.54 $\pm$ 0.16 (undiluted), 25.112 $\pm$ 0.06 ( $10^{-1}$  dilution), 28.80 $\pm$ 0.04 ( $10^{-2}$  dilution), 31.24 $\pm$ 1.31 ( $10^{-3}$  dilution) and 36.79 $\pm$ 1.03 ( $10^{-4}$  dilution), for the duplex assay. Student's t-test was performed to compare the Ct values obtained for the three replicates in both conditions. No significance differences at 95% confidence were found. Therefore, GPGV was detected in both assays with similar Cts, which means that the use of an internal control does not compromise the ability of the method to successfully detect the virus.



**Fig 1. Validation of the *V. vinifera* PEP internal control in the duplex real-time RT-PCR GPGV assay.** Three replicates of a GPGV infected plant extract were ten-fold serially diluted with healthy plant extract. Amplification plots by GPGV singleplex (blue) and GPGV-PEP duplex (red) real time RT-PCR assays are shown. Two negative controls (black) are included.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197237.g001>

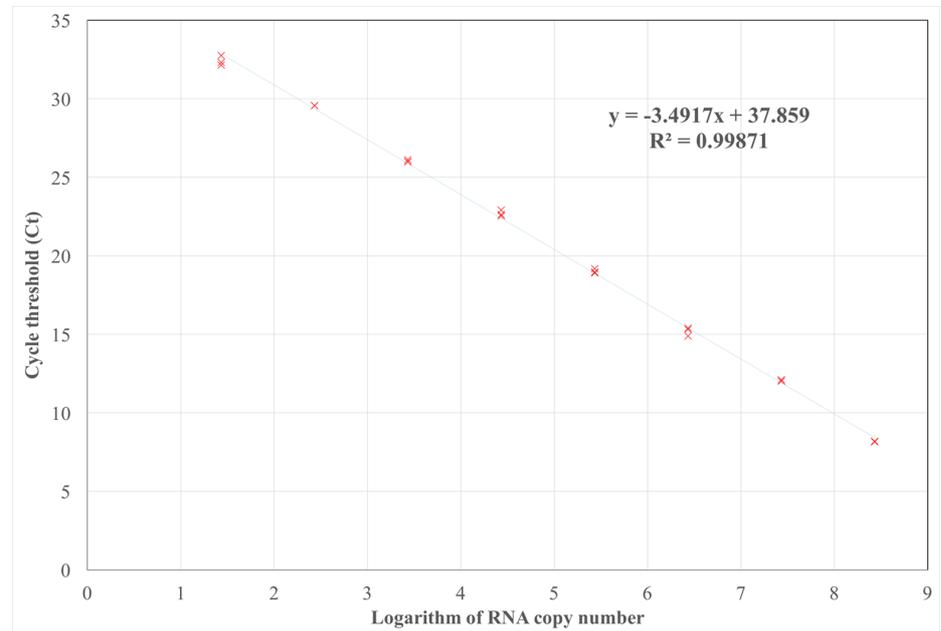
### Absolute quantitation and sensitivity of the detection method

Absolute quantitation of GPGV was performed using known quantities of *in vitro* synthesized GPGV transcripts of a region of the MP/CP genes. Three replicates of ten-fold serial dilutions of the transcripts allowed to establish a quantitation range from  $3 \times 10^8$  to 30 transcript copies (Fig 2). The slope of the standard curve (-3.49) was used to calculate an amplification efficiency of 93.43% with a coefficient of correlation ( $R^2$ ) of 0.99. The detection limit of the method was slightly higher when plant material was analyzed, being 70 the minimum amount of viral copies detected (data not shown).

The sensitivity of the GPGV quantitative real-time RT-PCR method developed was compared to that of the real-time qPCR method based on SYBR Green chemistry previously reported [4]. Several ten-fold serial dilutions of GPGV infected plant extracts with healthy plant extracts were tested by both methods (Table 1). The real-time RT-PCR developed in this study was able to detect the virus up to two ten-fold dilutions further than the previously reported method, showing thus a higher sensitivity for GPGV detection.

### Use of the duplex quantitative real-time RT-PCR for GPGV diagnosis

A random survey was conducted to evaluate the incidence of GPGV in the D.O. Utiel-Requena, one of grapevine growing areas where GPGV was detected for the first time in Spain



**Fig 2. Absolute GPGV quantitation standard curve.** Cycle threshold (Ct) values obtained for three replicates of ten-fold serial dilutions of GPGV control transcripts are plotted. The mathematical equation of the standard curve used to quantify the real-time RT-PCR assays and the coefficient of correlation ( $R^2$ ) are indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197237.g002>

[5]. GPGV was detected in 22 from a total of 178 samples analyzed by quantitative real-time RT-PCR, corresponding to plants from three different grapevine local varieties (Bobal, Macabeo and Tintorerera). In 5 negative samples, no amplification of the internal plant control was obtained. Consequently, these putative false negative results were discarded. Thus, the estimated prevalence of the virus in these vineyards was 12.7%. The Ct values observed ranged from 18.5 to 33.8 which corresponded to a titer between  $1.1 \times 10^8$  to  $1.6 \times 10^3$  viral copies detected (Table 2). Evaluation of symptoms in these samples revealed the presence of GPGV in both plants showing chlorotic mottling and asymptomatic grapevines.

### Presence of other grapevine viruses

The possible presence of other grapevine viruses known to infect and produce symptoms in grapevine was evaluated. The results of this study showed that most of the GPGV infected samples detected (19 out of 22) were co-infected with one or more grapevine viruses tested

**Table 1. Sensitivity comparison between TaqMan and SYBR Green GPGV real-time RT-PCR detection methods.**

qPCR method	Targeted region	Undiluted extract	Serial dilutions <sup>a</sup>						
			$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
TaqMan (this study)	MP/CP	+	+	+	+	+	-	-	-
SYBR Green (Bertazzon et al. [4])	RdRp	+	+	+	-	-	-	-	-
	CP	+	+	+	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Ten-fold serial dilutions of GPGV infected plant material with healthy plant extracts

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197237.t001>

**Table 2. Real-time RT-PCR cycle threshold (Ct) values for GPGV and PEP internal control, absolute quantitation, symptomatology and presence of other grapevine viruses in GPGV positive samples collected from D.O. Utiel-Requena.**

Sample	Variety	Ct Values (GPGV <sup>a</sup> )	Viral titer	Ct Values (PEP)	Symptoms <sup>b</sup>	Other viruses <sup>c</sup>
RQ25	Bobal	25.0	1.7 x 10 <sup>5</sup>	20.2	CM, LD	GFLV, GLRaV-3
RQ30	Bobal	23.4	3.9 x 10 <sup>5</sup>	21.6	CM, LD	GFkV, GFLV, GLRaV-3
RQ99	Macabeo	21.2	1.3 x 10 <sup>6</sup>	21.3	CM	GFLV, GFkV, GLRaV-2
RQ106	Macabeo	23.1	4.5 x 10 <sup>5</sup>	20.6	SL	GLRaV-2
RQ108	Macabeo	23.2	4.4 x 10 <sup>5</sup>	21.5	CM	GFLV
RQ109	Macabeo	23.2	4.4 x 10 <sup>5</sup>	18.7	CM	GFLV
RQ110	Macabeo	23.2	4.4 x 10 <sup>5</sup>	19.7	CM	GFLV
RQ111	Tintorera	22.9	5.2 x 10 <sup>5</sup>	21.7	CM	GFLV
RQ113	Tintorera	20.5	1.8 x 10 <sup>6</sup>	21.6	CM	GFLV
RQ115	Tintorera	24.7	2.0 x 10 <sup>5</sup>	21.9	CM	GFLV
RQ116	Bobal	26.6	7.5 x 10 <sup>4</sup>	22.0	CM	-
RQ117	Bobal	18.5	1.1 x 10 <sup>8</sup>	21.9	CM	-
RQ118	Bobal	27.5	4.6 x 10 <sup>4</sup>	22.8	CM	-
RQ121	Tintorera	32.3	3.6 x 10 <sup>3</sup>	22.7	SL	GLRaV-3, GFkV
RQ124	Tintorera	30.9	7.8 x 10 <sup>3</sup>	23.5	SL	GFLV
RQ125	Tintorera	23.2	4.3 x 10 <sup>5</sup>	22.7	SL	GFLV, GLRaV-2
RQ136	Bobal	24.2	2.6 x 10 <sup>5</sup>	20.3	CM	GFLV
RQ140	Bobal	31.5	5.7 x 10 <sup>3</sup>	20.7	CM	GFLV
RQ142	Bobal	32.6	3.2 x 10 <sup>3</sup>	20.5	SL	GLRaV-2, GLRaV-3
RQ143	Bobal	33.8	1.6 x 10 <sup>3</sup>	21.0	CM	GLRaV-2, GLRaV-3
RQ145	Macabeo	32.0	4.2 x 10 <sup>3</sup>	20.5	CM	GFLV
RQ150	Macabeo	33.2	2.3 x 10 <sup>3</sup>	20.7	CM	GFLV
RQ151	Macabeo	33.0	2.6 x 10 <sup>3</sup>	20.8	CM	GFLV
RQ160	Tintorera	32.7	3.0 x 10 <sup>3</sup>	24.0	CM	GFLV

<sup>a</sup> *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV)

<sup>b</sup> Chlorotic mottling (CM); Leaf deformation (LD); Symptomless (SL).

<sup>c</sup> *Grapevine fanleaf virus* (GFLV); *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2); *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3); *Grapevine fleck virus* (GFkV).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197237.t002>

(Table 2). GFLV was the most common co-infecting virus, being present in 15 of the 22 samples. GFkV, GLRaV-2 and GLRaV-3 were also detected in some samples. The presence of mixed infections was detected in both symptomatic and symptomless plants.

### New polymorphism on the GPGV MP/CP genes of Spanish isolates

The 228 bp MP/CP fragment targeted by the real-time RT-PCR was successfully amplified by conventional RT-PCR in 18 of the GPGV infected plants detected and in two Spanish positive controls (RQ30 and RQ25). Sanger sequencing of these amplicons showed the presence of a new polymorphism in the MP/CP gene, not previously reported (Fig 3). This polymorphism, detected in the Spanish isolates RQ30 and RQ25, involves the presence of a translational stop signal one codon downstream from the polymorphism reported by Saldarelli et al. [3]. The presence of this single nucleotide polymorphism would determine the synthesis of a five amino acids shorter MP. Although both RQ30 and RQ25 show GPGV related symptoms, such as chlorotic mottling and leaf deformation, this polymorphism is not present in other symptomatic plants. In 4 of the samples analyzed (RQ99, RQ106, RQ108 and RQ113) the polymorphism previously reported in the literature was found in both symptomatic and symptomless plants.

### Phylogenetic study of GPGV Spanish isolates

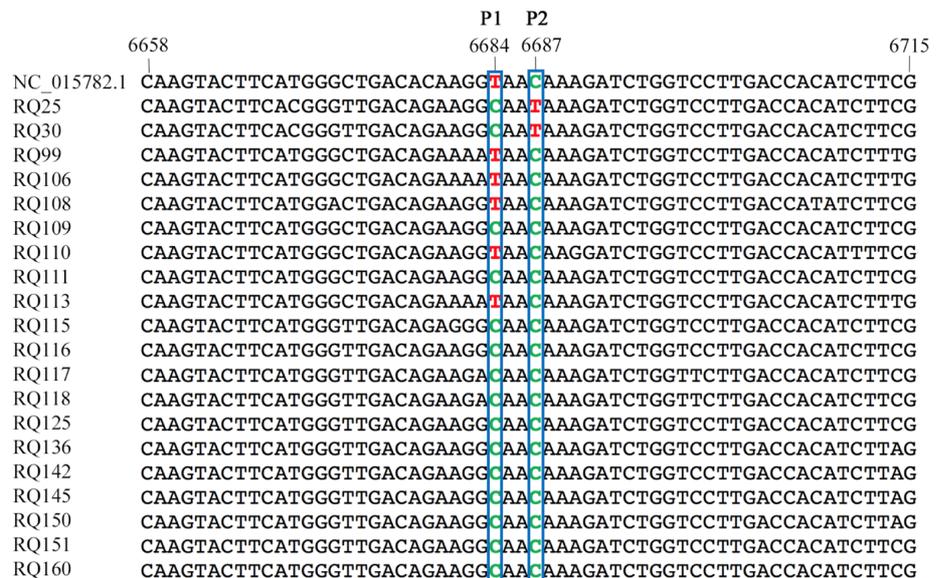
In order to study the phylogenetic significance of the new polymorphism found in the GPGV MP/CP region, a phylogenetic study based on a 548 pb fragment of the MP/CP gene was conducted. A phylogenetic tree, including 12 Spanish isolates representing different polymorphisms and 8 reference sequences representative of the three clades (A, B and C) identified by Saldarelli et al. [3] and Bertazzon et al. [4], was constructed (Fig 4). Spanish isolates did not cluster in any particular clade but were distributed along all the three clades. Interestingly, the two isolates (RQ30 and RQ25) showing the new MP/CP polymorphism did not group in the same clade where isolates with the polymorphism previously reported by Saldarelli et al. [3] are located. Isolates containing the new polymorphism seems to be phylogenetically classified to a different clade (identified as clade A by Saldarelli et al. [3] and Bertazzon et al. [4]).

### Determination of the GPGV titer in the putative transmission vector *Colomerus vitis*

The real-time RT-PCR method developed in this study was applied for the quantitative detection of GPGV in the putative transmission vector *C. vitis*. Pools of 15, 10, 5 and single mites fed on GPGV infected fresh leaves were analyzed after an acquisition period of five days. GPGV was successfully detected in all samples, including single mites (Fig 5). *C. vitis* fed on healthy grapevine leaves were used as negative controls. The average viral titer in a single *C. vitis* was 306 (standard error  $\pm 6$ ) copies of GPGV under our experimental conditions. The average viral titer calculated in the pools gave a quantification of  $161 \pm 15$  viral copies per mite.

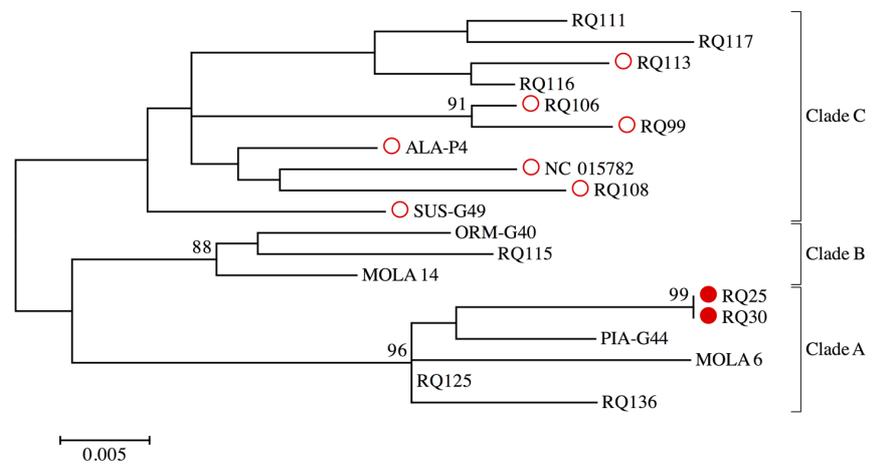
### Discussion

Quantitative real-time PCR methods have been shown to be powerful tools for viral epidemiological studies and viral detection. In this study, we report the development of a specific real-



**Fig 3. Sequence alignment of the MP/CP region targeted by the real-time RT-PCR assay of 20 GPGV Spanish isolates using GPGV IT isolate (NC\_015782.1).** Two polymorphisms producing a shorter MP: P1 (previously reported by Saldarelli et al. [3]) at position 6,684 and P2 (new polymorphism identified in this work) at position 6,687 are indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197237.g003>



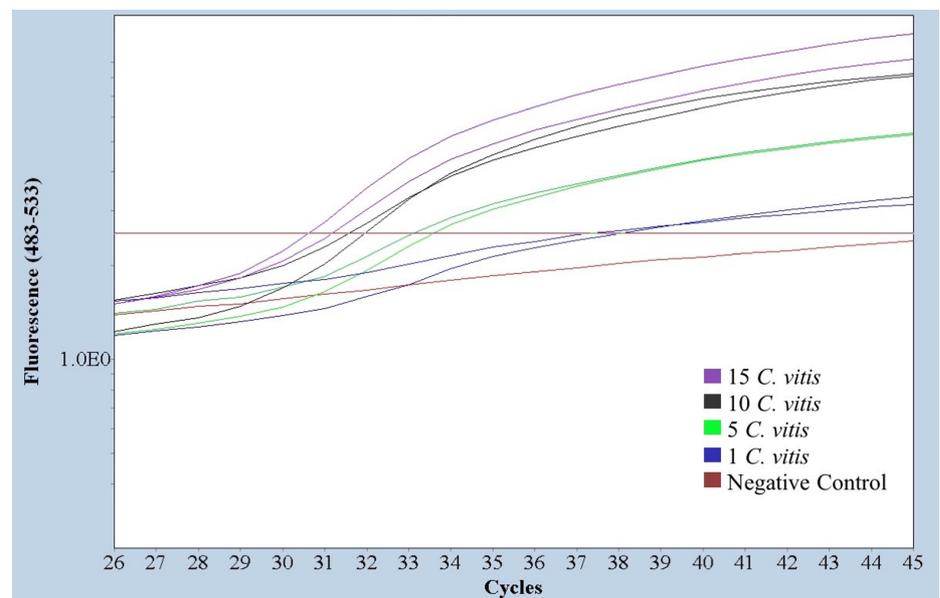
● New polymorphism detected in this study

○ Polymorphism reported by Saldarelli et al.[3]

**Fig 4. Phylogenetic analysis of Spanish GPGV isolates by Maximum likelihood method.** Trees were generated under the Tamura 3 model of nucleotide substitution. Branches supported by a minimum of 75% of 2,000 bootstrap replicates.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197237.g004>

time RT-PCR detection method able to perform an absolute quantitation of GPGV in both plant material and transmission vectors, which represents a useful and reliable tool in the diagnosis and study of this plant pathogen.



**Fig 5. Absolute quantitation of GPGV in the putative transmission vector *C. vitis*.** Amplification plots obtained for pools of 15 (purple), 10 (black) and 5 (green) and individual mites (blue) are shown. A negative control of mites fed on GPGV free leaves (brown) is included.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197237.g005>

The method here described has been designed as a duplex RT-PCR reaction that includes an internal plant control, the *V. vinifera* phosphoenolpyruvate carboxylase gene (*PEP*) reported by Borges et al. [19] as a useful housekeeping gene for transcriptional studies performed by real-time PCR. The results presented in this work show the absence of a negative effect of the duplex reaction on the GPGV technical sensitivity of the method, as the signal obtained by the duplex reaction was similar to that obtained in a singleplex assay. In addition, the sensitivity in the detection of GPGV of the TaqMan method developed here is higher than the sensitivity of a real-time qPCR method based on SYBR Green chemistry previously reported [4]. Moreover, the diagnostic sensitivity, that is the ability of a technique to detect the true positives among all the infected plants:  $\text{sensitivity} = \text{true positives} / (\text{true positives} + \text{false negatives})$  [24] is increased in our method, as the use of a grapevine internal control in the real-time RT-PCR reduces the number of false negative results. In fact, some of the plants analyzed in this study that tested negative for GPGV did not provide a positive detection on the grapevine *PEP* gene, allowing the identification of these samples as putative false negative results. To our knowledge this is the first GPGV detection method that includes such plant internal control.

This method also allows the absolute quantitation of GPGV titer not only in plant material but also in transmission vectors. In fact, we have been able to determine the viral titer present in a single *C. vitis* mite. The average number of copies detected in single mites was  $306 \pm 6$ . Interestingly, the viral titer calculated in mite pools gave an average number of copies per mite ( $161 \pm 15$ ) that lied in the same order of magnitude, suggesting a homogeneous distribution of the amount of viral particles present in this putative GPGV transmission vector.

The real-time RT-PCR described in this work has been used to study the incidence of GPGV in the grapevine growing area D.O. Utiel-Requena. The estimated prevalence of the virus found in these vineyards was 12.7%. Only some of the infected plants, 17 of 22 showed GPGV related symptoms, as chlorotic mottling, being asymptomatic the rest of the isolates detected. The presence of other grapevine viruses (such as GFLV, GFkV, GRLaV-2 and GLRaV-3) has been detected in many of the GPGV infected plants. However, no clear association was found between the symptomatology observed and the presence of these mixed infections, as some of the asymptomatic samples also showed GPGV and other viruses co-infections. Other factors such as viral titer have been reported to be involved in the development of symptoms [4] highlighting the importance of the performance of an accurate and absolute quantitation of GPGV. In this study, no clear association between the symptoms and GPGV titer has been observed, however the reduced number of isolates analyzed due to the low incidence of GPGV in the grapevine growing area surveyed could explain this finding. A more exhaustive survey on different GPGV affected Spanish vineyards could help to address this issue.

The new method targets the MP/CP gene, an interesting region of GPGV genome where other authors have reported the existence of a polymorphism responsible for a six amino acids shorter MP [2, 3]. The amplification and sequencing of this genomic region of Spanish isolates has allowed us to identify a new polymorphism in this gene. This polymorphism is located one codon downstream the previously reported one and has a similar effect on GPGV MP, making the protein five amino acids shorter in this case. The phylogenetic study of these genome variants showed that the new polymorphism clusters in a different clade than the polymorphism previously reported in the literature. This phylogenetic divergence suggests that the existence of these two different polymorphisms that result in a similar shortening of the GPGV MP are independent evolutionary events which biological significance remains unclear. The finding of a new phylogenetically unrelated polymorphism gives new insights in the study of GPGV genomic variability. The symptomatology observed in this study in the Spanish local varieties

analyzed did not seem to be correlated to the MP/CP polymorphism reported by Saldarelli et al. [3] nor with the new polymorphism detected in this work. These findings raise an important issue about GPGV symptomatology that needs to be addressed taking into account multiple factors that may interact in the development of the grapevine leaf mottling and deformation disease. Further characterization of GPGV Spanish isolates and their phylogenetic relationships, the study of the susceptibility of the local grapevine varieties and the use of cDNA infectious clones will help to understand the biological significance of this emergent pathogen.

In conclusion, we report the development of a novel specific and quantitative GPGV detection method based on TaqMan real-time RT-PCR. This method, that allows the absolute quantitation of GPGV, improves the diagnostic sensitivity of GPGV detection by the false negative results reduction provided by the use of a plant internal control. Accurate estimation of the number of virions might be essential in understanding the development of the grapevine leaf mottling and deformation disease. Moreover, the method here described allows the absolute quantitation of GPGV in single putative transmission vectors such as *C. vitis* and could be a key factor in epidemiological and plant resistance studies and control strategies.

## Acknowledgments

This work was supported by the projects INIA RTA-2014-00061 and INIA E-RTA2017-00009. Also, it has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 734736. The research was conducted within the framework of COST Action FA1407. LP and MG were also supported by the grant VEGA2/0036/16 from the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education and Slovak Academy of Sciences.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Antonio Olmos, Lukáš Predajňa, Miroslav Glasa, Ana B. Ruiz-García.

**Formal analysis:** Antonio Olmos, Ana B. Ruiz-García.

**Funding acquisition:** Antonio Olmos.

**Investigation:** Félix Morán, Leonidas Lotos, Ana B. Ruiz-García.

**Methodology:** Antonio Olmos, Lukáš Predajňa, Nikolaos Katis, Miroslav Glasa, Ana B. Ruiz-García.

**Resources:** Nikolaos Katis, Miroslav Glasa, Varvara Maliogka.

**Supervision:** Antonio Olmos, Varvara Maliogka, Ana B. Ruiz-García.

**Validation:** Ana B. Ruiz-García.

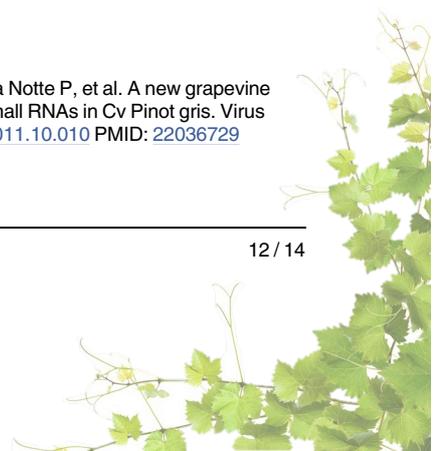
**Visualization:** Antonio Olmos, Ana B. Ruiz-García.

**Writing – original draft:** Ana B. Ruiz-García.

**Writing – review & editing:** Antonio Olmos, Leonidas Lotos, Miroslav Glasa, Varvara Maliogka, Ana B. Ruiz-García.

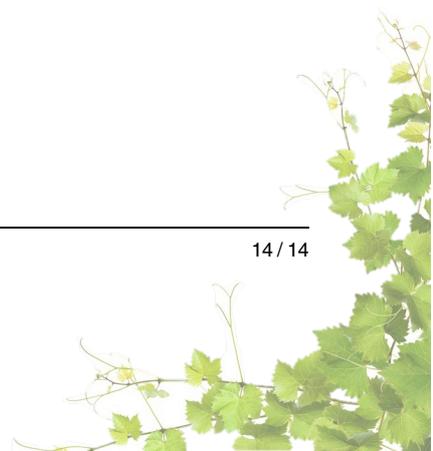
## References

1. Giampetruzzi A, Roumi V, Roberto R, Malossini U, Yoshikawa N, La Notta P, et al. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Research*. 2012; 163(1):262–8. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.010> PMID: 22036729



2. Glasa M, Predajna L, Kominek P, Nagyova A, Candresse T, Olmos A. Molecular characterization of divergent *Grapevine Pinot gris virus* isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Archives of Virology*. 2014; 159(8):2103–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2031-5> PMID: 24599565
3. Saldarelli P, Giampetruzzi A, Morelli M, Malossini U, Pirola C, Bianchedi P, et al. Genetic variability of *Grapevine Pinot gris virus* and its association with grapevine leaf mottling and deformation. *Phytopathology*. 2015; 105(4):555–63. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0241-R> PMID: 25423070
4. Bertazzon N, Forte V, Filippin L, Causin R, Maixner M, Angelini E. Association between genetic variability and titre of *Grapevine Pinot gris virus* with disease symptoms. *Plant Pathology*. 2017; 66(6):949–59. <https://doi.org/10.1111/ppa.12639>
5. Ruiz-Garcia AB, Olmos A. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* in grapevine in Spain. *Plant Disease*. 2017; 101(6):1070–1. <https://doi.org/10.1094/pdis-12-16-1858-pdn>
6. Martins Fajardo TV, Eiras M, Nickel O. First report of *Grapevine Pinot gris virus* infecting grapevine in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*. 2017; 12(1). <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0270-5>
7. Wu Q, Habili N. The recent importation of *Grapevine Pinot gris virus* into Australia. *Virus Genes*. 2017; 53(6):935–8. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1475-6> PMID: 28612275
8. Saldarelli P, Gualandri V, Malossini U, Glasa M. Grapevine Pinot gris virus. In: Meng B, Martelli GP, Golino DA, Fuchs M, editors. *Grapevines viruses: Molecular biology, diagnostics and management*. Berlin: Springer International Publishing.; 2017. p. 351–63
9. Bertazzon N, Filippin L, Forte V, Angelini E. *Grapevine Pinot gris virus* seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy. *Archives of Virology*. 2016; 161:711–714. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2718-2> PMID: 26666440
10. Gualandri V, Asquini E, Bianchedi P, Covelli L, Brilli M, Malossini U, et al. Identification of herbaceous hosts of the *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV). *European Journal of Plant Pathology*. 2017; 147(1):21–5. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0989-4>
11. Malagnini V, de Lillo E, Saldarelli P, Beber R, Duso C, Raiola A, et al. Transmission of *Grapevine Pinot gris virus* by *Colomerus vitis* (Acari: *Eriophyidae*) to grapevine. *Archives of Virology*. 2016; 161(9):2595–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2935-3> PMID: 27344161
12. Beuve M, Candresse T, Tannieres M, Lemaire O. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) in grapevine in France. *Plant Disease*. 2015; 99(2):293–4. <https://doi.org/10.1094/pdis-10-14-1008-pdn>
13. Olmos A, Bertolini E, Gil M, Cambra M. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*. 2005; 128(1–2):151–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.05.011> PMID: 15964640
14. Beuve M, Sempe L, Lemaire O. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. *Journal of Virological Methods*. 2007; 141(2):117–24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.042> PMID: 17223202
15. Bertolini E, Moreno A, Capote N, Olmos A, de Luis A, Vidal E, et al. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*. 2008; 120(2):177–88. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9206-9>
16. Velasco L, Bota J, Montero R, Cretazzo E. Differences of three ampeloviruses' multiplication in plant may explain their incidences in vineyards. *Plant Disease*. 2014; 98(3):395–400. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-13-0433-re>
17. Becker N, Rimbaud L, Chiroleu F, Reynaud B, Thebaud G, Lett J-M. Rapid accumulation and low degradation: key parameters of *Tomato yellow leaf curl virus* persistence in its insect vector *Bemisia tabaci*. *Scientific Reports*. 2015; 5. <https://doi.org/10.1038/srep17696> PMID: 26625871
18. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013; 30(12):2725–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197> PMID: 24132122
19. Borges AF, Fonseca C, Ferreira RB, Lourenco AM, Monteiro S. Reference gene validation for quantitative RT-PCR during biotic and abiotic stresses in *Vitis vinifera*. *Plos One*. 2014; 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111399> PMID: 25340748
20. Avogadro A. Essai d'une manière de déterminer les masses relatives des molécules élémentaires des corps, et les proportions selon lesquelles elles entrent dans ces combinaisons. *Journal of Physics* 1811; 73:58.
21. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2000; 25(2):169–93. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169> PMID: 11013345
22. Bertolini E, García J, Yuste A, Olmos A. High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*. 2010; 128(3):283–7. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9663-4>

23. Osman F, Leutenegger C, Golino D, Rhowani A. Real-time RT-PCR (TaqMan ) assays for the detection of *Grapevine leafroll associated viruses* 1–5 and 9. *Journal of Virological Methods*. 2007; 141(1):22–9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.035> PMID: 17223203
24. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests I: Sensitivity and specificity. 1994; 308:1552. PMID: 8019315





Article

# Specific Real-Time PCR for the Detection and Absolute Quantitation of Grapevine Roditis Leaf Discoloration-Associated Virus, an EPPO Alert Pathogen

Félix Morán <sup>1</sup> , Chrysoula-Lito Sassalou <sup>2</sup>, Celia Canales <sup>1</sup>, Varvara I. Maliogka <sup>2</sup> , Antonio Olmos <sup>1</sup> and Ana Belén Ruiz-García <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera km 4.5, Moncada, 46113 Valencia, Spain; moran\_fel@gva.es (F.M.); celia.cq@hotmail.com (C.C.); aolmos@ivia.es (A.O.)

<sup>2</sup> Plant Pathology Laboratory, School of Agriculture, Faculty of Agriculture, Forestry and Natural Environment, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece; sassalou@agro.auth.gr (C.-L.S.); vmaliogk@agro.auth.gr (V.I.M.)

\* Correspondence: ana.belen.ruiz@uv.es

Received: 10 August 2020; Accepted: 3 September 2020; Published: 4 September 2020

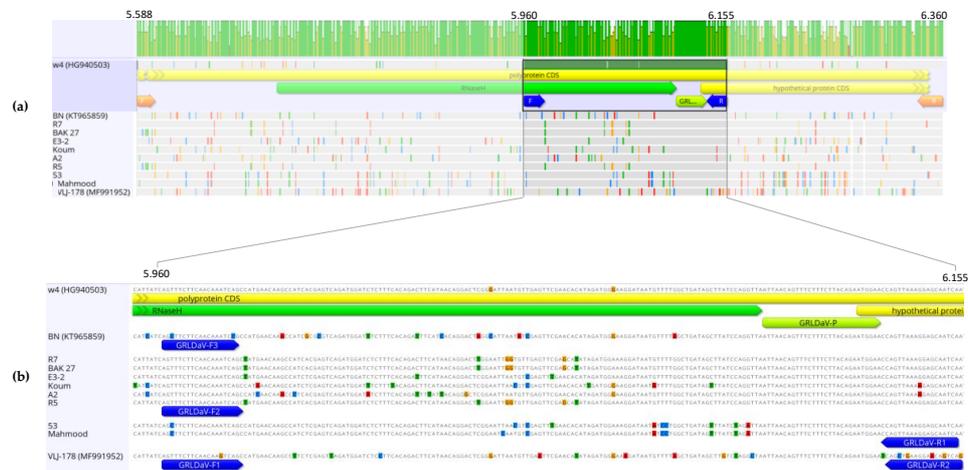


**Abstract:** Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV) is an emerging grapevine pathogen included in the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) alert list due to its ability to damage grapevine crops and cause production losses. This work aimed to develop a specific and reliable diagnostic tool that would contribute to preventing the spread of this pathogen. Therefore, a TaqMan real-time quantitative PCR was developed. The method was validated according to EPPO guidelines showing a high degree of analytical sensitivity, analytical specificity, selectivity, and repeatability and reproducibility. The sensitivity of this method is much higher than the sensitivity reached by previously reported methods even when tested in crude extracts, which could allow rapid testing by avoiding nucleic acid extraction steps. The method was also able to detect GRLDaV isolates from all the geographic origins reported so far, despite their high degree of genetic diversity. In addition, this new technique has been successfully applied for the quantitative detection of GRLDaV in plant material and two mealybug species, *Planococcus citri* and *Pseudococcus viburni*. In conclusion, the methodology developed herein represents a significant contribution to the diagnosis and control of this emerging pathogen in grapevine.

**Keywords:** GRLDaV; plant virus diagnostics; grapevine; real-time PCR

## 1. Introduction

Grapevine (*Vitis vinifera*) is one of the most ancient crops cultivated worldwide for the production of both fresh grapes and wine, which represents an important source of income for many countries. Europe is the leading global wine producer, with about 50% of the world's vine-growing area, with 3.3 million ha (Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division, FAOSTAT, 2018). Grapevine can be affected by virus and virus-like diseases that may significantly reduce the productive life of the plants as well as the grape production in terms of the quantity and quality of the berries [1]. In fact, the grapevine has been described as the crop that hosts the largest number of plant viruses, with more than 85 viral species known to infect this important crop to date [2,3].



**Figure 1.** (a) Nucleotide alignment of 775 nt partial genomic sequences in the open reading frame 4 (ORF4) region (RNaseH) amplified from Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV) isolates from different geographical origins. The corresponding region of three GRLDaV full-length sequences available in the databases is included. Alignment was performed by ClustalW implemented in MEGA X software. (b) One hundred and ninety-six nucleotide genomic target region, primers (blue arrows), and probe (green arrow) designed for the real-time qPCR developed in this study are indicated.

The sequence alignment showed a highly conserved small region that could be a good candidate for the TaqMan probe. Regions surrounding the alignment site showed some sequence variability that was related to the isolates' geographical origins. That variability could be overcome by designing either degenerated primers or several primers for use in multiplex PCR. Due to the high number of degenerations to be introduced, the use of degenerated primers could create problems related to primer concentration that could compromise detection sensitivity, as degenerations reduce the final concentration of each particular sequence. Taking this into account, the multiplexing approach was selected.

Thus, five primers able to cover all the variability observed in the sequence alignment and specifically amplify a region of 196 nt (ref-seq genomic positions 5960 to 6155, accession number NC\_027131.1) from all isolates having different geographic origins were designed (Figure 1). The primers GRLDaV-F1 (5'AGTTTCTTCAACAAGTCAGC3', sense), GRLDaV-F2 (5'AGTTTCTTCAACAAATCAGC3', sense), and GRLDaV-F3 (5'AGCTTCTTCAACAAATCCG3', sense) exhibited perfect alignment to Croatian, Turkish, and Italian/Greek isolates, respectively. The primer GRLDaV-R1 (5'TGATTGCTCRITTAAGTGG 3', antisense) included only one degenerated position and was able to align perfectly to all isolates except the Croatian isolate. And the primer GRLDaV-R2 (5' GACTGTTCTTACAGCTG 3', antisense) was designed specifically for the Croatian isolate. Furthermore, a single TaqMan probe specific for all the sequences analyzed was found, GRLDaV-P (5'-6-FAM-ATTAACAGTTTCTTCTTACAGAATGGAA-BHQ1-ZNA4-3').

### 2.1.2. Specific Detection of GRLDaV by Real-Time qPCR

The ability of the real-time qPCR developed in this study to detect GRLDaV was evaluated in 22 isolates from different geographical origins, 17 isolates from Greece (G47 3PR, R5, R7, R8, R11, R12, R14, BAK-27, Koum, D2-1, HL-1, G4-1, G14-2, E3-2, P3, P4, and Auth-48), 2 isolates from Turkey (53 and Mahmood), 2 isolates from Italy (BN GRLDaV 3005 and BN GRLDaV 1405), and 1 isolate from Croatia (VLJ-178). Three replicates of all samples gave a positive detection for GRLDaV, with mean Ct values and their standard deviations ranging from  $17.24 \pm 0.39$  to  $32.90 \pm 0.42$ . No signal was

Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV) was identified as a new member of the family *Caulimoviridae*, genus *Badnavirus*, infecting grapevine in 2015 [4]. GRLDaV has been associated with a grapevine disease reported in Greece more than thirty years ago, the Roditis leaf discoloration disease (RLD), which produces discolorations and deformations of the leaves, reduction in the number and size of grape berries, and a lower sugar content [5]. The analysis by high throughput sequencing (HTS) of a grapevine sample showing typical RLD symptoms from a Greek vineyard allowed the identification of GRLDaV and the recovery of its full genome [4]. The GRLDaV genome consists of a single molecule of circular double-stranded DNA (between 6988 and 7097 nt in length) that includes four open reading frames (ORFs) and a non-coding region. ORFs 1, 2, and 4 encode for hypothetical proteins of unknown function. ORF3 encodes a large polyprotein containing the movement protein (MP), the coat protein (CP), the protease, the reverse transcriptase (RT), and the RNaseH [4]. GRLDaV has been shown to be mechanically transmissible. Although no biological vectors have been identified to transmit GRLDaV to date, most badnaviruses are spread by different mealybug species [6].

After its first identification in Greece, GRLDaV has also been reported in Italy [7], Turkey [8], and Croatia [9]. The previous evidence of the ability of this virus to damage grapevine crops and to cause losses, along with its emergence in several European countries, point to the need for the control and prevention of its spread. In fact, GRLDaV was included in the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) alert list as a potential phytosanitary risk for the EPPO region in October 2018. Management and control of viral pathogens and prevention of their spread lay on early detection based on specific and reliable diagnostic methods. Quantitative real-time PCR methods have been shown to be powerful tools for viral epidemiological studies and viral detection [10–15]. This work aimed to develop a specific real-time PCR detection method that can perform an absolute quantitation of GRLDaV genetic material in both plant material and mealybugs. Such a technique could be applied to epidemiological studies and would provide a powerful tool to address control strategies designed to prevent GRLDaV spread.

## 2. Results

### 2.1. Detection of GRLDaV by Real-Time qPCR

#### 2.1.1. Design of Real-Time qPCR Primers and Probe

A nucleotide sequence alignment of the GRLDaV complete genomic sequences available in GenBank, from isolates W4 (Crete, Greece), BN (Italy), and VLJ-178 (Croatia) showed a high degree of divergence between them, with an overall nucleotide identity ranging from 84.24% to 89.31%, although the similarity between the sequences was quite variable throughout the genome. With the aim of selecting a target genomic region that could provide specific, broad, and reliable GRLDaV detection, a more in-depth study was conducted in the RNaseH domain inside the ORF4, one of the most conserved genomic regions used for genus *Badnavirus* specific detection [16]. The sequence variability study in this genomic region led to the selection of a small region of 211 nt (ref-seq genomic positions 5951 to 6161, accession number NC\_027131.1), with a nucleotide identity ranging from 85.78% to 93.36% between isolates, as a candidate for primers and probe designing. A larger genomic fragment of 775 nt containing the region of study was amplified by PCR from nine GRLDaV isolates from different geographical origins (Greece and Turkey). The sequences were aligned with the homologous genomic region of the full-length sequences available in the databases from Greece, Italy, and Croatia. (Figure 1).

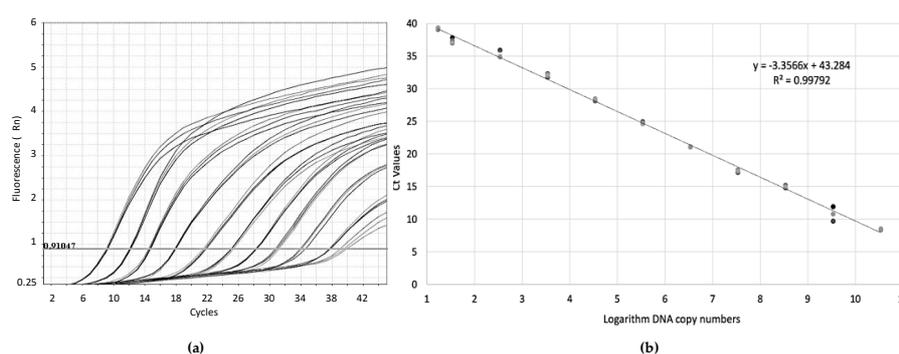
detected for negative controls, three tip-culture sanitized grapevine plants and eight GRLDaV-free grapevine plants infected with several common grapevine viruses and viroids (grapevine fanleaf virus, grapevine fleck virus, grapevine leafroll-associated virus 1, grapevine leafroll-associated virus 2, grapevine leafroll-associated virus 3, grapevine red globe virus, grapevine rupestris vein feathering virus, grapevine Syrah virus 1, grapevine virus A, grapevine virus B, grapevine virus E, grapevine virus F, grapevine virus G, grapevine virus L, grapevine yellow speckle viroid-1, grapevine yellow speckle viroid-2, hop stunt viroid and grapevine rupestris stem pitting-associated virus 1).

An additional 65 grapevine plants randomly collected from two Greek grapevine growing areas (Athens and Pieria) were tested by the real-time qPCR method developed. A total of 15 plants were positive for GRLDaV (23.07%) with Ct values ranging from 17.62 to 27.19.

## 2.2. Validation of the Real-Time qPCR Method

### 2.2.1. Absolute Quantitation and Analytical Sensitivity

For the absolute quantitation of the technique, known quantities of the GRLDaV genomic region targeted by the real-time qPCR inserted in a plasmid were used. Serial dilutions of plasmid DNA allowed the generation of standard curves (Figure 2) with an amplification efficiency of 98.57% and a coefficient of correlation of 0.99. The quantitation range of the real-time qPCR was established from  $3 \times 10^{10}$  to 20 target copies.



**Figure 2.** (a) Amplification plots by GRLDaV real-time qPCR for three replicates of serial dilutions of plasmid DNA containing the GRLDaV target region. (b) Quantitation standard curve generated. Both the mathematical equation of the curve and the coefficient of correlation ( $R^2$ ) are indicated.

The sensitivity of the developed real-time qPCR in plant material was evaluated using both crude extracts and purified DNA from GRLDaV infected samples. In addition, a sensitivity comparison between our method and two previously reported detection methods, a conventional genus-specific PCR [16], and a GRLDaV specific real-time PCR based on SYBR Green chemistry [4] was carried out. These results are shown in Table 1. The detection limit determined in plant material was around 30 viral copies when testing purified DNA. Crude extracts samples provided a much higher detection limit; a minimal number of 4400 viral targets were needed for detection. The real-time qPCR developed in this study was much more sensitive than the previously described techniques, five orders of magnitude higher than the conventional PCR, and two orders of magnitude higher than the SYBR Green real-time PCR. It is noteworthy that even using crude extracts, the method here developed exhibited higher sensitivity than the currently available diagnostic tools which use purified DNA.

**Table 1.** Analytical sensitivity of the real-time qPCR developed compared to the sensitivity of two previously reported Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV) detection methods [4,16].

Serial Dilutions <sup>1</sup>	Real-Time qPCR (This Study)		SYBR Green Real-Time PCR [4]	Conventional PCR [16]
	Viral Titer <sup>2</sup> (Purified DNA)	Signal (Crude Extract)	Signal (Purified DNA)	Signal (Purified DNA)
undiluted	$5.22 \times 10^6$	+	+	+
$10^{-1}$	$7.18 \times 10^8$	+	+	+
$10^{-2}$	$6.31 \times 10^7$	+	+	+
$10^{-3}$	$1.01 \times 10^6$	+	+	+
$10^{-4}$	$2.74 \times 10^5$	+	+	–
$10^{-5}$	$2.70 \times 10^4$	+	+	–
$10^{-6}$	$4.40 \times 10^3$	+	+	–
$10^{-7}$	$3.30 \times 10^2$	–	–	–
$10^{-8}$	$2.88 \times 10^1$	–	–	–

<sup>1</sup> Ten-fold serial dilutions of GRLDaV infected grapevine extract in a healthy plant extract. <sup>2</sup> Mean viral titer (number of viral targets per 5  $\mu$ L of sample) of three replicates as determined by the real-time qPCR assay designed in this study.

## 2.2.2. Analytical Specificity and Selectivity

The inclusivity of the technique was evaluated by testing GRLDaV infected plants from different geographic origins showing genetic diversity among them. All isolates tested, representing the high variability observed in this virus, tested positive by the developed method.

The selectivity of the method was also addressed by testing isolates infecting different grapevine cultivars. The results showed that those variations in the matrix did not affect the test performance.

The exclusivity of the real-time PCR was evaluated by analyzing eight grapevine samples infected with several common grapevine viruses (grapevine fanleaf virus, grapevine fleck virus, grapevine leafroll-associated virus 1, grapevine leafroll-associated virus 2, grapevine leafroll-associated virus 3, grapevine red globe virus, grapevine rupestris vein feathering virus, grapevine Syrah virus 1, grapevine virus A, grapevine virus B, grapevine virus E, grapevine virus F, grapevine virus G, grapevine virus L, grapevine rupestris stem pitting-associated virus, grapevine yellow speckle viroid-1, grapevine yellow speckle viroid-2 and hop stunt viroid). All sample viromes were previously determined by HTS. None of these samples tested positive by the GRLDaV real-time qPCR developed in this study (Table 2).

**Table 2.** High throughput sequencing (HTS)-determined virome of eight grapevine samples used to evaluate the exclusivity of the real-time qPCR developed.

Sample Code	Variety	Total Numbers of Reads <sup>1</sup>	De Novo Contigs	Virome <sup>2</sup>
M2	Marsaoui	686,277	3019	GLRaV-1; GLRaV-2; GLRaV-3; GVF; GVA; GVB; RSPaV-1; GLRaV-2; GFLV; GYSVd-1; HSVd; GVL
U24	Bobal	3,095,597	1943	GLRaV-1; GLRaV-3; GYSVd-1; HSVd
R1	Red Globe	918,235	7884	GLRaV-2; GLRaV-3; GFKV; GVF; GVA; GFLV; GSyV-1; GYSVd-1; GYSVd-2; HSVd; GVL
R35	Bobal	3,735,091	5852	GLRaV-3; GRVfV; GFKV; GYSVd-1; HSVd
R5	Tempranillo	2,702,189	16,961	GLRaV-3; GRVfV; RSPaV-1; GVA; GRGV; GYSVd-1; HSVd
R3	RazzeGUI	1,647,485	6018	GPGV; GVF; GLRaV-1; GLRaV-2; GLRaV-3; GVA; GFKV; GVG; GVK; GFLV; RSPaV-1; GVB; HSVd; GYSVd-1; GVL
Pin1	Crimson seedless	8,642,008	14,375	GRVfV; GFKV; RSPaV-1; GVA; GLRaV-2; GYSVd-1; HSVd
R4	Tempranillo	2,410,654	13,303	RSPaV-1; GLRaV-3; GVA; GFKV; GRGV; GRVfV; GYSVd-1; HSVd

<sup>1</sup> After host genome subtraction. <sup>2</sup> Grapevine fanleaf virus (GFLV); Grapevine fleck virus (GFKV); Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1); Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2); Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3); Grapevine red globe virus (GRGV); Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV); Grapevine Syrah virus 1 (GSyV-1); Grapevine virus A (GVA); Grapevine virus B (GVB); Grapevine virus E (GVE); Grapevine virus F (GVF); Grapevine virus G (GVG); Grapevine virus L (GVL); Grapevine yellow speckle viroid-1 (GYSVd-1); Grapevine yellow speckle viroid-2 (GYSVd-2); Hop stunt viroid (HSVd); Grapevine rupestris stem pitting-associated virus 1 (RSPaV-1).

### 2.2.3. Repeatability and Reproducibility

Repeatability and reproducibility of the real-time qPCR were confirmed by testing seven GRLDaV positive samples with relatively low viral titers in nine technical repeats performed on different days by different operators and using three different thermal cyclers. All assays included three replicates for each sample. Mean Ct values, standard deviations, and coefficient of variation obtained for the technical repeats are shown in Table 3. Mean Ct values and standard deviations ranged from  $22.04 \pm 1.9$  to  $35.81 \pm 0.6$  (crude extract) and from  $19.82 \pm 0.73$  to  $33.21 \pm 1.33$  (purified DNA). The coefficient of variation observed was lower than 9% and ranged from 0.78 to 8.65 (crude extract) and from 1.14 to 8.99 (purified DNA).

**Table 3.** Repeatability and reproducibility of the real-time qPCR method. Each sample was analyzed in nine technical repeats in three different thermal cyclers (three repeats per instrument), testing both crude extracts and purified DNA.

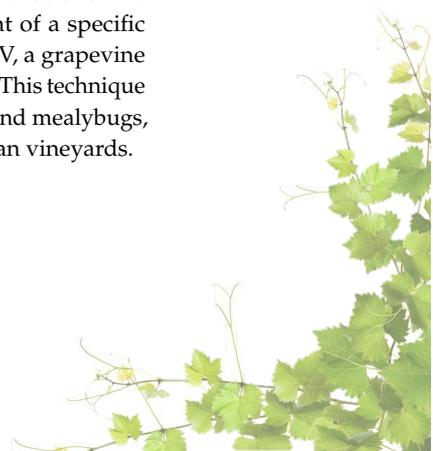
Sample Code	Crude Extract						Purified DNA					
	StepOne Plus		QuantStudio		Roche 480		StepOne Plus		QuantStudio		Roche 480	
	Mean Ct $\pm$ SD	CV (%)										
60.5	28.28 $\pm$ 1.42	5.03	30.63 $\pm$ 1.12	1.82	33.04 $\pm$ 0.29	0.91	22.95 $\pm$ 1.11	5.56	26.72 $\pm$ 0.63	2.37	27.41 $\pm$ 0.94	3.46
60.11	22.04 $\pm$ 1.90	8.65	24.74 $\pm$ 1.25	5.08	26.04 $\pm$ 0.86	3.32	20.94 $\pm$ 0.92	8.90	22.48 $\pm$ 1.92	8.54	23.09 $\pm$ 1.10	4.77
60.15	26.90 $\pm$ 1.6	6.22	28.92 $\pm$ 0.9	3.17	29.77 $\pm$ 0.86	2.91	21.09 $\pm$ 0.60	2.87	24.89 $\pm$ 0.43	1.62	25.82 $\pm$ 0.29	1.14
60.16	25.91 $\pm$ 1.16	6.31	27.86 $\pm$ 1.5	2.32	31.31 $\pm$ 0.45	1.12	20.73 $\pm$ 1.70	3.35	23.30 $\pm$ 0.49	2.13	23.97 $\pm$ 0.70	13.65
60.17	27.78 $\pm$ 1.48	5.33	29.21 $\pm$ 0.22	0.78	30.36 $\pm$ 0.36	1.19	21.15 $\pm$ 0.52	5.24	24.55 $\pm$ 0.29	1.19	26.04 $\pm$ 0.76	1.72
60.21	32.05 $\pm$ 2.08	6.51	35.81 $\pm$ 0.6	5.89	30.52 $\pm$ 0.23	1.16	27.05 $\pm$ 0.56	2.07	30 $\pm$ 0.42	1.43	33.21 $\pm$ 1.33	8.99
60.23	22.95 $\pm$ 1.42	6.23	24.70 $\pm$ 0.3	1.25	27.12 $\pm$ 0.61	2.25	19.82 $\pm$ 0.73	4.69	21.98 $\pm$ 0.88	4.01	23.76 $\pm$ 1.41	5.94

### 2.3. Quantitative Detection of GRLDaV in Mealybugs

The real-time qPCR method here developed was applied for the quantitative detection of GRLDaV in two mealybug species, *Planococcus citri* and *Pseudococcus viburni*. Nine replicates of pools of 2 and 4, as well as individual mealybugs, fed on GRLDaV infected fresh leaves, were analyzed. GRLDaV was successfully detected in all samples, including single mealybugs. No signal was detected for insects fed on healthy grapevine leaves. Viral titers quantified, as well as the mean viral titers for both pools and singles mealybugs and standard deviations, are shown in Supplementary Table S1. Under our experimental conditions, the viral titer determined in *P. citri* in single mealybugs ranged from 99 to 668 viral copies, with a mean viral titer of  $321.76 \pm 201.97$ . Viral quantification in mealybug pools ranged from 128 to 1300 copies (for 2 insect pools) and from 234 to 1325 copies (for 4 insect pools), with a mean viral titer of  $651.11 \pm 345.59$  and  $987.33 \pm 233.93$  copies, respectively ( $325.55 \pm 172.79$  and  $246.83 \pm 108.91$  copies per mealybug). For *P. viburni* the mean viral titer in single mealybugs was  $136.53 \pm 45.61$  (from 54 to 192). Quantification on insect pools ranged from 271 to 691 (2 insect pools) and from 179 to 659 (4 insect pools), which represents a mean viral titer of  $466.66 \pm 155.49$  and  $506.11 \pm 194.10$ , respectively ( $233.22 \pm 77.74$  and  $126.53 \pm 48.52$  per mealybug). GRLDaV acquisition and detection experiments with *P. citri* and *P. viburni* showed the ability of these two mealybug species to carry GRLDaV, and the performance of the real-time qPCR developed in this study to detect and quantify GRLDaV in putative mealybugs.

## 3. Discussion

Quantitative real-time PCR detection methods are powerful and reliable diagnostic tools for the control and management of viral diseases. In this study, we report the development of a specific real-time qPCR method that allows the detection and absolute quantitation of GRLDaV, a grapevine virus included in the EPPO alert list as a potential phytosanitary risk for the EPPO region. This technique performs specific and reliable quantitative detection of GRLDaV in both plant material and mealybugs, a key step to preventing the spread of this pathogen in the European and Mediterranean vineyards.



The GRLDaV genomic sequence shows a high degree of variability, related to its geographical distribution, which might compromise its reliable diagnosis. With the aim of designing a detection method able to deal with this variability, viral sequences from all known GRLDaV-affected geographic locations were analyzed. The real-time qPCR method developed in this study has been shown to specifically cover all known GRLDaV diversity by using a unique TaqMan probe in a highly conserved region of the RNase H domain in ORF4. Five primers, three forward primers, and two reverse primers, working in a single multiplex reaction, were designed to amplify a small region containing the probe target sequence as an alternative of highly degenerated primers that could compromise efficient primer concentrations and detection sensitivity. In fact, the technique has been shown to exhibit not only a high degree of specificity towards its target but also a high level of sensitivity in GRLDaV detection. In addition, this method can also be successfully applied for the absolute quantitation of GRLDaV in both plant material and mealybugs.

The GRLDaV detection method here described has been validated evaluating its analytical sensitivity, analytical specificity, selectivity, and repeatability and reproducibility according to the EPPO guidelines.

First, the method showed a high sensitivity in GRLDaV detection using both crude extracts and purified DNA. In fact, the sensitivity of the technique was much higher than the sensitivity reached by two previously reported detection methods based on conventional generic PCR [16] and SYBR Green real-time PCR [4]. The comparison between the three techniques showed that the sensitivity of the new method was two orders of magnitude higher with respect to the conventional PCR and five orders of magnitude higher with respect to the SYBR Green real-time PCR, with a detection limit of around 30 copies in naturally infected plant material. Moreover, the real-time qPCR developed in this work was able to test crude extracts with a similar sensitivity to the previously reported real-time method testing purified DNA samples. This result raises the possibility of avoiding nucleic acid extraction steps for rapid testing, although sensitivity is two orders of magnitude higher when purified DNA is tested. In any case, the method reported herein provides increased sensitivity in GRLDaV detection compared to existing diagnostic tools.

In addition, the specificity and selectivity of our method were also validated. The assay turned out to be highly specific according to the results obtained for both inclusivity and exclusivity. All GRLDaV isolates analyzed from different geographic origins covering the actual known viral diversity tested positive by the technique. On the other hand, none of the sanitized grapevine nor GRLDaV-free grapevine plants bearing several grapevine common viruses tested positive in our assay, demonstrating the high level of analytical specificity of the method provided herein. In addition, the selectivity of the assay was also shown by its accurate performance in different cultivars of the host plant.

Finally, the repeatability and reproducibility of the method were also demonstrated. A series of nine technical repeats of seven relatively low titer samples tested with three different thermal cyclers on different days and by different operators was successfully performed. The coefficient of variation observed in the analysis results was lower than 9% for all the samples tested, indicating the absence of significant deviations on the technique performance.

The validated technique was applied for the detection of GRLDaV in mealybugs *P. citri* and *P. viburni*. Under our experimental conditions, both mealybug species were able to carry the virus, with their viral titer being successfully quantified by our method. Whether these mealybug species are indeed transmission vectors of this virus remains to be studied. However, the ability of this technique to be applied for those epidemiological studies and used for vector-mediated spread control has been demonstrated.

In conclusion, in this study, we have developed a novel real-time qPCR method for the detection and absolute quantitation of GRLDaV that has been successfully applied for diagnosis in both grapevine plants and mealybugs. The technique has been validated according to EPPO guidelines showing a high sensitivity, specificity, selectivity, and repeatability and reproducibility. This new detection method

could contribute to future epidemiological studies and to preventing the spread of this potential pathogen between grapevine plants.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Plant Material

A total of 22 GRLDaV infected grapevine samples from different origins and varieties were selected as positive controls for this study: 17 samples from Greece (cv. Roditis, Dafnia, Mavrothiriko, Moschato Samou, Korinthiaki stafida, Romeiko, Lagorghi, Assyrtiko, and Koumario); 2 samples from Turkey (cv. Yalova incisi) kindly supplied by Dr. Ulubaş Serçe (Niğde Ömer Halisdemir University); 2 samples from Italy (cv. Bombino Nero) kindly supplied by Dr. Minafra (CNR-IPSP); and 1 sample from Croatia (cv. Ljutun) kindly supplied by Dr. Vončina (University of Zagreb). The presence of GRLDaV in all positive samples was confirmed by PCR using two different sets of primers. Badna-R-Up (5'GAAGGAATTGAATCTCCAGCAGCAGG3', sense) and Badna-R-Do (5'CTCTGCTACACCAAGTGATAGATTGTTGAG3', antisense) [4] and Badna-FP (5'ATGCCITYGGIAARAAYGCIC3', sense) and Badna-RP (5'CCAYTTRCAIACISICCCCAICC3', antisense) [16]. Plant material from grapevines (cv. Bobal, Tempranillo, Marsaoui, Razzegui, Red Globe, and Crimson seedless) analyzed by high throughput sequencing (HTS), harboring different non targeted viruses, and from Spanish grapevine cultivars (cv. Aledo and Ideal) sanitized by tip culture was used as negative control and for specificity assays. In addition, 65 grapevine samples randomly collected from two Greek grapevine growing areas (Athens and Pieria) were analyzed.

##### 4.2. Crude Extract Preparation and DNA Purification

Leaf tissue from each plant sample was placed in individual plastic bags (Bioreba, Reinach, Switzerland). Extraction buffer (PBS containing 0.2% diethyldithiocarbamate and 2% PVP-10) was added up to a 1:5 ratio (w:v). Homex 6 homogenizer (Bioreba, Reinach, Switzerland) was used for grinding. For crude extract qPCR real-time analysis, 1:50 plant extract dilutions were performed in H<sub>2</sub>O, centrifuged at 20,000× g for 1 min, heated at 95 °C for 10 min, and placed on ice. DNA was purified from 200 µL of the same plant extracts using a Plant/Fungi DNA isolation kit (Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canada) following the manufacturer's instructions. Extracted DNA was quantified with a DeNovix DS-11 spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA) to determine the DNA concentrations and stored at −80 °C until subsequent analysis.

Total DNA was extracted from mealybugs using a Plant/Fungi Total DNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canada) with slight modifications. Briefly, 400 µL of PBS 1X buffer was added to tubes containing 1, 2, 4, or 5 mealybugs. The suspension was vortexed for 5 min in the presence of 212–300 µm glass beads (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After centrifugation at 10,000× g for 5 min, 200 µL of the clarified supernatant was transferred to a fresh tube, and the extraction procedure was completed following the manufacturer's instructions.

##### 4.3. Amplification and Sequencing of a Partial GRLDaV RNaseH/ORF4 Genomic Region

Alignment of the three GRLDaV full genomes available in the databases [17] corresponding to isolates W4, BN, and VLJ-178 from Greece, Italy, and Croatia, respectively (accession numbers HG940503, KT965859, and MF991952) was performed using ClustalW implemented in Geneious software 10.0.7 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). Based on this alignment, primers targeting a 775 nt in the GRLDaV genome including part of the RNaseH sequence (ORF3) and part of the ORF4 region, GRLDaV-RNaseH-F (5'AGCCCACTCTATGCYARACAAG3', sense), and GRLDaV-RNaseH-R (5'TGCTTTCTTTGCTGACTCAGCTTC3', antisense) were designed manually. Primers and probe melting temperatures and secondary structures were analyzed using the online OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA). A 775 bp fragment was amplified from nine selected GRLDaV positive samples from different origins: sample R5 (Crete, Greece); sample R7



(Crete, Greece); sample BAK-27 (Nemea, Peloponese, Greece); sample Koum (Tinos island, Greece); sample D2-1 (Grapevine Institute, Athens, Greece); sample E3-2 (Grapevine Institute, Athens, Greece); sample VLJ-178 (Kaštela, Croatia); sample 53 (Adana province, Turkey) and sample Mahmood (Adana Province, Turkey). PCR amplification was performed using Platinum Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions. The reaction mixture contained 0.5  $\mu$ M of each primer, 0.75  $\mu$ L of KB Extender, and 40 ng of DNA in a volume of 3  $\mu$ L, in a total reaction volume of 25  $\mu$ L. PCR protocol consisted of a first step at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of amplification (30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, and 48 s at 72 °C). All PCR amplicons were cleaned using mi-PCR Purification Kit (Metabion International AG, Martinsried, Germany), and Sanger sequenced in both directions.

#### 4.4. Primers and Probe Design

All amplified RNaseH/ORF4 sequences, as well as the corresponding genomic region of the GRLDaV full-length sequences available in the databases (HG940503, KT965859, and MF991952), were aligned using ClustalW implemented in MEGA X software [18]. Based on the alignment, a set of five primers and a probe were designed for the real-time PCR assay. Three forward primers and two reverse primers were designed to cover all the variability detected in the selected region, yielding an amplicon of 196 bp: GRLDaV-F1 (5'AGTTTCTTCAACAAGTCAGC3', sense); GRLDaV-F2 (5'AGTTTCTTCAACAAATCAGC3', sense); GRLDaV-F3 (5'AGCTTCTTCAACAAATCCG3', sense); GRLDaV-R1 (5'TGATTGCTCRITTAAGTGG 3', antisense); and GRLDaV-R2 (5' GACTGTTCCCTTCAGCTG 3', antisense). A TaqMan probe, GRLDaV-P (5'-6-FAM-ATTAACAGTTTCTTCTTACAGAATGGAA-BHQ1-ZNA4-3') showed specificity towards all the sequences used in the study.

#### 4.5. TaqMan Quantitative Real-Time PCR

TaqMan qPCR was performed in three different real-time thermal cyclers: StepOne Plus thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); QuantStudio 3 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland), using a Premix Ex Taq master mix for probe-based real-time PCR (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) according to the manufacturer's instructions. Five microliters containing 70 ng of DNA or 5  $\mu$ L of crude extract were used as a template. The reaction mixture contained 250 nM of the probe and 0.35  $\mu$ M of each of the primers in a total reaction volume of 20  $\mu$ L. For reactions performed in the Applied Biosystems instruments, 0.4  $\mu$ L of the ROX Reference Dye (50X) was added as a passive reference dye. PCR reaction consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 2 min, followed by 45 cycles of amplification (15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C). Data acquisition and analysis were performed using the corresponding software for each thermal cycler. The default threshold set by the machines was slightly adjusted above the noise to the linear part of the growth curve at its narrowest point, according to the manufacturer.

#### 4.6. Generation of Real-Time qPCR Standard Curves

For the generation of real-time qPCR standard curves, the RNaseH fragment targeted by the qPCR was amplified by conventional PCR using primers GRLDaV-F2 and GRLDaV-R1. The 196 bp PCR product was purified using a PCR Purification Kit (Metabion International AG, Martinsried, Germany) following the manufacturer's instructions, inserted in the pGEM-T Easy vector (Promega Corporation, Madison, OH, USA), and cloned into *Escherichia coli* XL1-Blue. Transformant colonies were selected by ampicillin resistance. Plasmid extraction was performed using the mi-Plasmid Miniprep Kit (Metabion International AG, Martinsried, Germany) following the manufacturer's instructions and quantified with a DeNovix DS-11 spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA). Plasmid DNA was quantified in picomoles applying the following mathematical formula: pmol of dsDNA = ( $\mu$ g of dsDNA  $\times$  10<sup>6</sup>)/(660  $\times$  Nbp) considering the average molecular weight of a pair of

nucleotides (660 Da) and the number of base pairs of the plasmid carrying the GRLDaV partial genomic RNaseH sequence (Nbp). The Avogadro constant [19] was used to estimate the number of plasmid molecules ( $6.023 \times 10^{23}$  molecules/mol). Three replicates of serial dilutions from  $3 \times 10^{10}$  to 2 plasmid copies were prepared and used to generate the standard curve. The amplification efficiency of the calibration curve was calculated by the slope, according to the mathematical formula: amplification efficiency =  $[10^{(-1/\text{slope})}] - 1$  [20].

#### 4.7. Validation of the Real-Time qPCR Method

The real-time qPCR method developed in this study was validated according to the EPPO guidelines [21]. Thus, analytical sensitivity (maximum dilution of DNA detected), analytical specificity (inclusivity, detection of variants/strains covering genetic diversity and different geographic origin; exclusivity, negative detection of relevant non-targets that might be present in the matrix), selectivity (evaluation of test performance using different cultivars), and repeatability and reproducibility (evaluation of the test performance consistency on different replicates by different operators and with different equipment) were evaluated.

##### 4.7.1. Evaluation of the Sensitivity

Analytical sensitivity of the real-time PCR developed in this study was evaluated using crude extracts or purified DNA from GRLDaV naturally infected plant material. The crude extracts were tested at 1:50 dilution in distilled H<sub>2</sub>O. DNA was purified from GRLDaV infected plant extract and from ten-fold serial dilutions (from  $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ ) of the infected plant extract in healthy plant extract, to avoid dilution of putative PCR inhibitors present in the matrix. Absolute quantitation was performed, generating standards curves as described above, and viral titer, the number of viral targets per volume, was determined. Three replicates of each sample were tested. All samples were tested by two previously described GRLDaV detection methods [4,16] for sensitivity comparison.

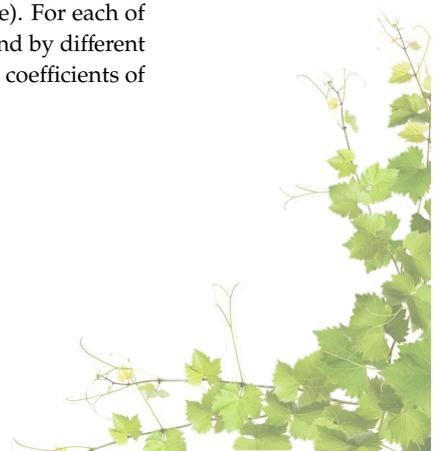
##### 4.7.2. Evaluation of the Specificity

The inclusivity and selectivity of the developed detection method were evaluated by testing GRLDaV isolates from different geographic origins showing genetic diversity and infecting different cultivars.

Exclusivity was evaluated by testing eight grapevine samples infected by several viruses commonly present in the host. The virome of these samples, not infected by GRLDaV, was determined by high throughput sequencing (HTS), as described previously [22]. Briefly, total RNA was extracted from leaves and sequenced after ribo-depletion using RNAseq TrueSeq Illumina technology (150 nt pair-end reads). Data analysis was performed by CLC Genomics Workbench 10.1.1 (QIAGEN, Hilden, Germany). Raw data were subjected to quality control, trimming, and host genome subtraction steps, and the resulting reads used to assemble de novo contigs (minimal contig length 200 nt). The contigs similarity to viral sequences was analyzed by BLASTn and BLASTx with a cut-off e-value of  $10^{-4}$ .

##### 4.7.3. Evaluation of the Repeatability and Reproducibility

For evaluation of the repeatability and reproducibility of the real-time qPCR, seven surveyed samples that tested positive for GRLDaV with the lowest viral titers were selected. Both crude extract and purified DNA of the selected samples were tested in nine technical repeats using three different thermal cyclers, QuantStudio 3 real-time PCR system Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and LightCycler 480 (Roche). For each of the instruments, 3 independent repeats were performed, carried out on different days, and by different operators. Technical repeats included 3 replicates for each sample. Mean Ct values and coefficients of variation were calculated.



#### 4.8. Quantitative Detection of GRLDaV in Mealybugs

Colonies of the *P. citri* and *P. viburni* mealybugs were kindly provided by Dr. Beitia (IVIA). Adult mealybugs were originally collected from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L.) located in a persimmon growing area in Algemés (Ribera del Xúquer, Valencia, Spain). Mealybug colonies were maintained in lemon fruits at 26 °C for 60 days. During this period, the absence of GRLDaV in the mealybugs was confirmed twice, every 30 days, by testing 5 pools of 5 mealybugs by both the conventional and the real-time GRLDaV PCR detection methods previously described [4,16] and by the real-time qPCR method developed in this study. GRLDaV-free mealybugs were transferred to both GRLDaV infected and healthy grapevine leaves. Acquisition was performed at 28 °C, 60% humidity and a 12/12 h light cycle for 48 h in a plant growth chamber (Sanyo MLR-350H). After this time, pools of 2 and 4 mealybugs, as well as individual insects, were analyzed by the real-time qPCR developed in this study. These experiments were performed in nine technical repeats.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2223-7747/9/9/1151/s1>. Table S1: GRLDaV titer in both pools and single mealybugs quantified by the real-time qPCR (species *P. citri* and *P. viburni*).

**Author Contributions:** Conceptualization: A.O., V.I.M., and A.B.R.-G.; methodology: A.O. and A.B.R.-G.; validation: F.M., C.-L.S., C.C., A.O., and A.B.R.-G.; formal analysis: F.M. and A.B.R.-G.; resources: A.O. and V.I.M.; writing—original draft preparation: A.B.R.-G.; writing—review and editing: F.M., C.-L.S., C.C., V.I.M., A.O., and A.B.R.-G.; funding acquisition: A.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by an Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) E-RTA2017-00009 grant and by the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme, under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 734736. This publication reflects only the authors' view. The Agency is not responsible for any use that may be made of the information it contains.

**Acknowledgments:** We would like to thank Ulubaş Serçe (Niğde Ömer Halisdemir University), Minafra (CNR-IPSP) and Vončina (University of Zagreb) for providing GRLDaV positive controls; and Beitia (IVIA) for supplying mealybugs.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

#### References

- Martelli, G.P. An overview on grapevine viruses, viroids and the diseases they cause. In *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostic and Management*; Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., Fuchs, M., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 31–46.
- Wu, Q.; Habili, N.; Constable, F.; Al Rwahnih, M.A.; Goszczynski, D.E.; Wang, Y.; Pagay, V. Virus Pathogens in Australian Vineyards with an Emphasis on Shiraz Disease. *Viruses* **2020**, *12*, 818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fuchs, M. Grapevine viruses: A multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *J. Plant Pathol.* **2020**, *102*, 643–653. [[CrossRef](#)]
- Maliogka, V.I.; Olmos, A.; Pappi, P.G.; Lotos, L.; Efthimiou, K.; Grammatikaki, G.; Candresse, T.; Katis, N.I.; Avgelis, A.D. A novel grapevine badnavirus is associated with the Roditis leaf discoloration disease. *Virus Res.* **2015**, *203*, 47–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rumbos, I.C.; Avgelis, A.D. Roditis Leaf Discoloration—A New Virus Disease of Grapevine: Symptomatology and Transmission to Indicator Plants. *J. Phytopathol.* **1989**, *125*, 274–278. [[CrossRef](#)]
- Bhat, A.I.; Hohn, T.; Selvarajan, R. Badnaviruses: The Current Global Scenario. *Viruses* **2016**, *8*, 177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chiumenti, M.; Morelli, M.; Giampetruzzi, A.; Palmisano, F.; Savino, V.N.; La Notte, P.; Martelli, G.P.; Saldarelli, P. First report of Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus in Italy. *J. Plant Pathol.* **2015**, *97*, 551. [[CrossRef](#)]
- Ulubaş Serçe, Ç.; Altan, B.; Bolat, V.; Ayyaz, M.; Çifçi, O.; Önder, S.; Öztürk Gökçe, Z.N.; Maliogka, V.I. First Report of Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus Infecting Grapevine (*Vitis vinifera*) in Turkey. *Plant Dis.* **2018**, *102*, 256. [[CrossRef](#)]

9. Voncina, D.; Almeida, R.P.P. Screening of some Croatian autochthonous grapevine varieties reveals a multitude of viruses, including novel ones. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 2239–2243. [[CrossRef](#)]
10. Olmos, A.; Bertolini, E.; Gil, M.; Cambra, M. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids. *J. Virol. Methods* **2005**, *128*, 151–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Beuve, M.; Sempé, L.; Lemaire, O. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting Grapevine leafroll-associated virus 2 variants in grapevine. *J. Virol. Methods* **2007**, *141*, 117–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bertolini, E.; Moreno, A.; Capote, N.; Olmos, A.; De Luis, A.; Vidal, E.; Pérez-Panadés, J.; Cambra, M. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* **2007**, *120*, 177–188. [[CrossRef](#)]
13. Velasco, L.; Bota, J.; Montero, R.; Cretazzo, E. Differences of Three Ampeloviruses' Multiplication in Plant May Explain Their Incidences in Vineyards. *Plant Dis.* **2014**, *98*, 395–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Becker, N.; Rimbaud, L.; Chiroleu, F.; Reynaud, B.; Thébaud, G.; Lett, J.-M. Rapid accumulation and low degradation: Key parameters of Tomato yellow leaf curl virus persistence in its insect vector Bemisia tabaci. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Morán, F.; Olmos, A.; Lotos, L.; Predajňa, L.; Katis, N.; Glasa, M.; Maliogka, V.; Ruiz-García, A.B. A novel specific duplex real-time RT-PCR method for absolute quantitation of Grapevine Pinot gris virus in plant material and single mites. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0197237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Yang, I.C.; Hafner, G.J.; Revill, P.A.; Dale, J.L.; Harding, R.M. Sequence diversity of South Pacific isolates of Taro bacilliform virus and the development of a PCR-based diagnostic test. *Arch. Virol.* **2003**, *148*, 1957–1968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. National Center for Biotechnology Information. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed on 2 September 2019).
18. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Niyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Avogadro, A. Essai d'une manière de déterminer les masses relatives des molécules élémentaires des corps. et les proportions selon lesquelles elles entrent dans ces combinaisons. *J. Phys.* **1811**, *73*, 58–76.
20. Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **2000**, *25*, 169–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. European and Mediterranean Plant Protection Organization. PM 7/98 (4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bul.* **2010**, *40*, 5–22. [[CrossRef](#)]
22. Ben Amar, A.; Daldoul, S.; Zemni, H.; Wetzels, T.; Olmos, A.; Ruiz-García, A.B. First report of Grapevine virus L in grapevine in Tunisia. *Plant Dis.* **2020**, in press. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## **8.2 Base de datos**

Número de acceso	Virus	Aislado	Hospedador	Origen	Fecha de subida a la base de datos	Tamaño (nt)
BK011060	Grapevine Pinot gris virus	ERR922628-GPGV	Vitis vinifera cultivar Chardonnay	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011061	Grapevine Pinot gris virus	ERR922630-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Alicante Bouschet	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011062	Grapevine Pinot gris virus	ERR922630-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Alicante Bouschet	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011063	Grapevine Pinot gris virus	ERR922630-GPGV3	Vitis vinifera cultivar Alicante Bouschet	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011064	Grapevine Pinot gris virus	ERR922631-GPGV	Vitis vinifera cultivar Lambrusco	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011065	Grapevine Pinot gris virus	ERR922632-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Cabernet Franc	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011066	Grapevine Pinot gris virus	ERR922632-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Cabernet Franc	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011067	Grapevine Pinot gris virus	ERR922633-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Kozma Ploskei Muskotaly	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011068	Grapevine Pinot gris virus	ERR922633-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Kozma Ploskei Muskotaly	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011069	Grapevine Pinot gris virus	ERR923264-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Teroldego	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011070	Grapevine Pinot gris virus	ERR923264-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Teroldego	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011071	Grapevine Pinot gris virus	ERR926756-GPGV	Vitis vinifera cultivar Sangiovese	Italy: Coll. IASMA, Trento	2011	>560
BK011072	Grapevine Pinot gris virus	SRR1631863-67-68-GPGV	Vitis vinifera cultivar Primitivo-Refosco	Italy: Conegliano, Veneto	2011	>560
BK011073	Grapevine Pinot gris virus	SRR1658425-26-27-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	China: Changli, Hebei	2010	>560
BK011074	Grapevine Pinot gris virus	SRR1658425-26-27-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	China: Changli, Hebei	2010	>560
BK011075	Grapevine Pinot gris virus	SRR2120794-GPGV	Vitis vinifera cultivar Muscat Blanc pt grains	China: Changli, Hebei	2010	>560
BK011076	Grapevine Pinot gris virus	SRR2845691-GPGV	Vitis vinifera cultivar Summer Black	China: JARS, Nanjing	2010	>560
BK011077	Grapevine Pinot gris virus	SRR3167555-GPGV	Vitis vinifera cultivar Sauvignon blanc	France: Pessac-Leognan, Bordeaux	2013/2014	>560
BK011078	Grapevine Pinot gris virus	SRR3190105-GPGV	Vitis vinifera cultivar Tocai friulano (Sauvignonasse)	Italy: Univ. Of Udine	2013	>560
BK011079	Grapevine Pinot gris virus	SRR3190106-GPGV	Vitis vinifera cultivar Tocai friulano (Sauvignonasse)	Italy: Univ. Of Udine	2014	>560
BK011080	Grapevine Pinot gris virus	SRR3288835-GPGV	Vitis vinifera cultivar Merlot clone 181	Canada: Oliver, BC	2012	>560
BK011081	Grapevine Pinot gris virus	SRR5227657-GPGV	Vitis vinifera cultivar Pinot Noir ENTA115	Italy: San Michele all'Adige, Trentino	2012	>560
BK011082	Grapevine Pinot gris virus	SRR5332103-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Cabernet Franc	China: Beijing	Desconocida	>560
BK011083	Grapevine Pinot gris virus	SRR5332103-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Cabernet Franc	China: Beijing	Desconocida	>560
BK011084	Grapevine Pinot gris virus	SRR5332104-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Cabernet Franc	China: Beijing	Desconocida	>560
BK011085	Grapevine Pinot gris virus	SRR5332104-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Cabernet Franc	China: Beijing	Desconocida	>560
BK011086	Grapevine Pinot gris virus	SRR5332104-GPGV3	Vitis vinifera cultivar Cabernet Franc	China: Beijing	Desconocida	>560
BK011087	Grapevine Pinot gris virus	SRR5332107-GPGV	Vitis vinifera cultivar Merlot	China: Beijing	Desconocida	>560
BK011088	Grapevine Pinot gris virus	SRR5332108-GPGV	Vitis vinifera cultivar Merlot	China: Beijing	Desconocida	>560

## Anexos

BK011089	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457616-GPGV	Vitis vinifera cultivar Sangiovese	Italy: Bolgheri	2011	>560
BK011090	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457630-GPGV	Vitis vinifera cultivar Sangiovese	Italy: Bolgheri	2012	>560
BK011091	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457635-GPGV	Vitis vinifera cultivar Sangiovese	Italy: Bolgheri	2012	>560
BK011092	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457636-GPGV	Vitis vinifera cultivar Sangiovese	Italy: Riccione	2012	>560
BK011093	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457637-GPGV	Vitis vinifera cultivar Sangiovese	Italy: Riccione	2012	>560
BK011094	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457659-GPGV	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	Italy: Riccione	2012	>560
BK011095	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457660-GPGV	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	Italy: Riccione	2012	>560
BK011096	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457661-GPGV	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	Italy: Riccione	2012	>560
BK011097	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457662-GPGV-1	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	Italy: Bolgheri	2012	>560
BK011098	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457662-GPGV-2	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	Italy: Bolgheri	2012	>560
BK011099	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457663-GPGV-1	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	Italy: Bolgheri	2012	>560
BK011100	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457663-GPGV-2	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	Italy: Bolgheri	2012	>560
BK011101	Grapevine Pinot gris virus	SRR5457664-GPGV	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	Italy: Bolgheri	2012	>560
BK011102	Grapevine Pinot gris virus	SRR7275242-GPGV	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	France: Bordeaux	2013	>560
BK011103	Grapevine Pinot gris virus	SRR7275243-GPGV	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	France: Bordeaux	2013	>560
BK011104	Grapevine Pinot gris virus	SRR8260939-GPGV	Vitis vinifera cultivar Victoria	China	2014	>560
BK011105	Grapevine Pinot gris virus	SRR8260948-GPGV-1	Vitis vinifera cultivar Victoria	China	2014	>560
BK011106	Grapevine Pinot gris virus	SRR8260948-GPGV-2	Vitis vinifera cultivar Victoria	China	2014	>560
BK011107	Grapevine Pinot gris virus	SRR8260950-GPGV	Vitis vinifera cultivar Victoria	China	2014	>560
BK011108	Grapevine Pinot gris virus	SRR866574-GPGV	Vitis vinifera cultivar Tannat clone 717, ENTAV 1995	Uruguay: Mellila, Montevideo, planted in 2000	2011/2012	>560
BK011109	Grapevine Pinot gris virus	SRR866575-GPGV	Vitis vinifera cultivar Tannat clone 717, ENTAV 1995	Uruguay: Mellila, Montevideo, planted in 2000	2011/2012	>560
FR877530	Grapevine Pinot gris virus	SK30	Vitis vinifera	Italy	Desconocida	>560
KF134123	Grapevine Pinot gris virus	SK01	Vitis vinifera	Slovakia	Desconocida	>560
KF134124	Grapevine Pinot gris virus	SK13	Vitis vinifera	Slovakia	Desconocida	>560
KF134125	Grapevine Pinot gris virus	SK107	Vitis vinifera	Slovakia	Desconocida	>560
KF134126	Grapevine Pinot gris virus	SK53	Vitis vinifera	Slovakia	Desconocida	>560
KF134127	Grapevine Pinot gris virus	SK53	Vitis vinifera	Slovakia	Desconocida	>560

KF134128	Grapevine Pinot gris virus	SK312	Vitis vinifera	Slovakia	Desconocida	>560
KF134129	Grapevine Pinot gris virus	SK56	Vitis vinifera	Slovakia	Desconocida	>560
KF686810	Grapevine Pinot gris virus	SK30-1	Vitis vinifera	Slovakia	1/6/12	>560
KM491305	Grapevine Pinot gris virus	Mer	Vitis vinifera (Merlot)	France	2010	>560
KP693444	Grapevine Pinot gris virus	TL_21	Vitis vinifera	Czech Republic	2013	>560
KP693445	Grapevine Pinot gris virus	TL_25	Vitis vinifera	Czech Republic	2013	>560
KP693446	Grapevine Pinot gris virus	7_2_5	Vitis vinifera	Czech Republic	2013	>560
KP693447	Grapevine Pinot gris virus	20_5_3	Vitis vinifera	Czech Republic	2013	>560
KP693448	Grapevine Pinot gris virus	22_2_3	Vitis vinifera	Czech Republic	2013	>560
KP769553	Grapevine Pinot gris virus	G11s	Vitis vinifera cv. Glera	Italy	Desconocida	489
KT894101	Grapevine Pinot gris virus	GPV-TN	Vitis vinifera cv. Touriga Nacional ()	USA: Davis, CA	08-Aug-2015	>560
KU194413	Grapevine Pinot gris virus	BC-1	pinot gris	Canada	20/6/14	>561
KU312039	Grapevine Pinot gris virus	GPV_FEM01		Italy: Trentino, (TN)	5/6/13	>560
KU508673	Grapevine Pinot gris virus	Goldfinger		China	8/7/14	>560
KU949328	Grapevine Pinot gris virus	SK704	Vitis vinifera	Slovakia	Desconocida	>560
KX518620	Grapevine Pinot gris virus	K4	Vitis vinifera cv. Jarbola	Croatia	2015	>548
KX518621	Grapevine Pinot gris virus	K2	Vitis vinifera cv. Sansigot	Croatia	2015	>548
KX518622	Grapevine Pinot gris virus	K1	Vitis vinifera cv. Zlahtina		2015	>548
KX522755	Grapevine Pinot gris virus	Riesling 25-3	Vitis vinifera cv. Riesling	Germany	2015	>560
KY706085	Grapevine Pinot gris virus	PN	Vitis vinifera cv. Pinot Noir	France: Aube	20/7/15	>560
KY747493	Grapevine Pinot gris virus	SL13	Vitis vinifera cv. Bai-Ji-Xin	Pakistan	1/9/16	>560
KY747494	Grapevine Pinot gris virus	SL53	Vitis vinifera cv. Gui fei me gvi	Pakistan	1/9/16	>580
KY829001	Grapevine Pinot gris virus	CF-BR	Vitis vinifera cv. Cabernet Franc	Brazil	23-Jan-2017	>560
KY829002	Grapevine Pinot gris virus	ME-BR	Vitis vinifera cv. Merlot	Brazil	23-Jan-2017	>560
LC601811	Grapevine Pinot gris virus	H-JP1	Vitis coignetiae	Japan: Hokkaido, Hamatombetsu	9/9/20	>560
LC601812	Grapevine Pinot gris virus	H-JP2	Vitis coignetiae	Japan: Hokkaido, Hamatombetsu	9/9/20	>560
LN606702	Grapevine Pinot gris virus	MOLA 10	Vitis vinifera	Italy:Apulia	2014	>548
LN606703	Grapevine Pinot gris virus	MOLA 6	Vitis vinifera	Italy:Apulia	2014	>548
LN606704	Grapevine Pinot gris virus	MOLA 3x3	Vitis vinifera	Italy:Apulia	2014	>548
LN606705	Grapevine Pinot gris virus	MOLA 14	Vitis vinifera	Italy:Apulia	2014	>548
LN606706	Grapevine Pinot gris virus	MOLA 1	Vitis vinifera	Italy:Apulia	2014	>548
LN606707	Grapevine Pinot gris virus	CLONE505 3T	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2014	>548
LN606708	Grapevine Pinot gris virus	F18AV	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606709	Grapevine Pinot gris virus	F17AV	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606710	Grapevine Pinot gris virus	F16AV	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606711	Grapevine Pinot gris virus	F14N	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606712	Grapevine Pinot gris virus	F14A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606713	Grapevine Pinot gris virus	F13A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606714	Grapevine Pinot gris virus	BE5A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2011	>548

## Anexos

LN606715	Grapevine Pinot gris virus	BA(FA)P4	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606716	Grapevine Pinot gris virus	BE(FA)P2	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606717	Grapevine Pinot gris virus	BE(ac)	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2011	>548
LN606718	Grapevine Pinot gris virus	NAV9181N	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606719	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-9A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2011	>548
LN606720	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-5A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2011	>548
LN606721	Grapevine Pinot gris virus	PN-SO41A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2011	>548
LN606722	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-3N	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606723	Grapevine Pinot gris virus	BE(FA59)1A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2011	>548
LN606724	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-2N	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2,01	>548
LN606725	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-2A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606726	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-1N	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606727	Grapevine Pinot gris virus	ZA(PA)P4	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606728	Grapevine Pinot gris virus	ZA(PA)P2	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606729	Grapevine Pinot gris virus	ZA(PA)P1	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606730	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-10N	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606731	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-9A 13	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606732	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-8N	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606733	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-7N	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606734	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-7A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606735	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-6N	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606736	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-6A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606737	Grapevine Pinot gris virus	LA(GO)P5	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606738	Grapevine Pinot gris virus	MER(FA)1A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2011	>548
LN606739	Grapevine Pinot gris virus	ALA-P4	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2014	>548
LN606740	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-9N	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2011	>548
LN606741	Grapevine Pinot gris virus	ZA505-8A	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2013	>548
LN606742	Grapevine Pinot gris virus	ZA6Nclorosi	Vitis vinifera	Italy:Trentino	2011	>548
LT719093	Grapevine Pinot gris virus	F4P5.M44	Vitis vinifera	Moldova	1/10/16	>560
MF044018	Grapevine Pinot gris virus	CF-BR	Vitis vinifera cv. Cabernet Franc	Brazil	23/1/17	>560
MF044019	Grapevine Pinot gris virus	ME-BR	Vitis vinifera cv. Merlot	Brazil	23/1/17	>560
MG601793	Grapevine Pinot gris virus	101-144923	grapevine	Ukraine	2017	>543
MG601795	Grapevine Pinot gris virus	41B-3721	grapevine	Ukraine	2017	>560
MG601800	Grapevine Pinot gris virus	R-6846	grapevine	Ukraine	2017	>546
MG983746	Grapevine Pinot gris virus	3c	Vitis vinifera	United Kingdom	Apr-2017	>560
MH019203	Grapevine Pinot gris virus	RQ25	Vitis vinifera	Spain	2017	548
MH019204	Grapevine Pinot gris virus	RQ30	Vitis vinifera	Spain	2017	548
MH019205	Grapevine Pinot gris virus	RQ99	Vitis vinifera	Spain	2017	548
MH019206	Grapevine Pinot gris virus	RQ106	Vitis vinifera	Spain	2017	548

MH019207	Grapevine Pinot gris virus	RQ108	Vitis vinifera	Spain	2017	548
MH019208	Grapevine Pinot gris virus	RQ111	Vitis vinifera	Spain	2017	548
MH019209	Grapevine Pinot gris virus	RQ113	Vitis vinifera	Spain	2017	548
MH01921	Grapevine Pinot gris virus	RQ136	Vitis vinifera	Spain	2017	548
MH019210	Grapevine Pinot gris virus	RQ115	Vitis vinifera	Spain	2017	548
MH019211	Grapevine Pinot gris virus	RQ116	Vitis vinifera	Spain	2017	548
MH019212	Grapevine Pinot gris virus	RQ117	Vitis vinifera	Spain	2017	548
MH019213	Grapevine Pinot gris virus	RQ125	Vitis vinifera	Spain	2017	548
MH087439	Grapevine Pinot gris virus	fvG-Is1	Vitis vinifera	Italy	30/5/14	>560
MH087440	Grapevine Pinot gris virus	fvG-Is6	Vitis vinifera	Italy	30/5/14	>560
MH087441	Grapevine Pinot gris virus	fvG-Is7	Vitis vinifera	Italy	30/5/14	>560
MH087442	Grapevine Pinot gris virus	fvG-Is8	Vitis vinifera	Italy	30/5/14	>560
MH087443	Grapevine Pinot gris virus	fvG-Is12	Vitis vinifera	Italy	30/5/14	>560
MH087444	Grapevine Pinot gris virus	fvG-Is13	Vitis vinifera	Italy	30/5/14	>560
MH087445	Grapevine Pinot gris virus	fvG-Is14	Vitis vinifera	Italy	30/5/14	>560
MH087446	Grapevine Pinot gris virus	fvG-Is15	Vitis vinifera	Italy	30/5/14	>560
MH087447	Grapevine Pinot gris virus	fvG-Is17	Vitis vinifera	Italy	30/5/14	>560
MH802023	Grapevine Pinot gris virus	12G1110	Vitis vinifera		2-012	>560
MK201687	Grapevine Pinot gris virus	G7-Bekaa	Vitis vinifera	Lebanon	2018	>560
MK514519	Grapevine Pinot gris virus	S102	Vitis vinifera	USA	1/9/17	>560
MK514520	Grapevine Pinot gris virus	S103	Vitis vinifera; cv. Chardonnay	USA	1/9/17	>560
MK514521	Grapevine Pinot gris virus	S104	Vitis vinifera; cv. Chardonnay	USA	1/9/17	>560
MK514522	Grapevine Pinot gris virus	S105	Vitis vinifera; cv. Chardonnay	USA	1/9/17	>560
MK514523	Grapevine Pinot gris virus	S106	Vitis vinifera; cv. Chardonnay	USA	1/9/17	>560
MK514524	Grapevine Pinot gris virus	S123	Vitis vinifera; cv. Cabernet Sauvignon	USA	1/9/17	>560
MK514525	Grapevine Pinot gris virus	S107	Vitis vinifera; cv. Cabernet Sauvignon	USA	1/9/17	>560
MK514526	Grapevine Pinot gris virus	S111	Vitis vinifera	USA	1/9/17	>560
MK514527	Grapevine Pinot gris virus	S115	Vitis vinifera	USA	1/9/17	>560
MK514528	Grapevine Pinot gris virus	S142	Vitis vinifera	USA	1/9/17	>560
MK514529	Grapevine Pinot gris virus	S145	Vitis vinifera; cv. Cabernet Sauvignon	USA	1/9/17	>560
MK514530	Grapevine Pinot gris virus	S147	Vitis vinifera; cv. Zinfandel	USA	1/9/17	>560
MK514531	Grapevine Pinot gris virus	S148	Vitis vinifera; cv. Sauvignon Blanc	USA	1/9/17	>560
MK514532	Grapevine Pinot gris virus	S149	Vitis vinifera; cv. Chardonnay	USA	1/9/17	>560
MK514533	Grapevine Pinot gris virus	S150	Vitis vinifera; cv. Sauvignon Musque	USA	1/9/17	>560
MK514534	Grapevine Pinot gris virus	S335	Vitis vinifera	USA	1/9/17	>560
MK953676	Grapevine Pinot gris virus	HUCSK8	grapevine (Pinot gris)	Hungary: Csokako	1/7/17	>560
MK953677	Grapevine Pinot gris virus	HUCSK9s	grapevine (Pinot gris)	Hungary: Csokako	1/7/17	>560
MN093125	Grapevine Pinot gris virus	GPGV-136-NS-1	Riesling	Canada	2018	>561
MN228488	Grapevine Pinot gris virus	Regent-BE	Vitis vinifera cv. Regent	Belgium	1/5/18	>560

## Anexos

MN458411	Grapevine Pinot gris virus	Beb13-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Gewurztraminer	France: Beblenheim, Alsace	2017	>560
MN458412	Grapevine Pinot gris virus	Beb13-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Gewurztraminer	France: Beblenheim, Alsace	2017	>560
MN458413	Grapevine Pinot gris virus	Beb16-GPGV	Vitis vinifera cultivar Gewurztraminer	France: Beblenheim, Alsace	2017	>560
MN458414	Grapevine Pinot gris virus	Beb3-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Gewurztraminer	France: Beblenheim, Alsace	2017	>560
MN458415	Grapevine Pinot gris virus	Beb3-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Gewurztraminer	France: Beblenheim, Alsace	2017	>560
MN458416	Grapevine Pinot gris virus	Beb8-GPGV	Vitis vinifera cultivar Gewurztraminer	France: Beblenheim, Alsace	2017	>560
MN458417	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-10-14-GPGV	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458418	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-10-18-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458419	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-10-18-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458420	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-12-7-GPGV	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458421	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-2-27-GPGV	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458422	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-3-24-GPGV	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458423	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-3-26-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458424	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-3-26-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458425	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-3-27-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458426	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-3-27-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458427	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-3-35-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458428	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-5-36-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458429	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-5-36-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458430	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A2-37-GPGV	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458431	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A4-24-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458432	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A4-24-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458433	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A4-25-GPGV	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458434	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A5-23-GPGV	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458435	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A8-12-GPGV	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458436	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A8-20-GPGV	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458437	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A9-20-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458438	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A9-20-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458439	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A9-21-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458440	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A9-21-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458441	Grapevine Pinot gris virus	Ma17-A9-22-GPGV	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Chateauneuf-du-Pape	2017	>560
MN458442	Grapevine Pinot gris virus	GPgV_MID38_LYcovitis	Vitis vinifera cultivar Muskat Blume Metis Oberlin	France: Alsace	2014	>560
MN458443	Grapevine Pinot gris virus	Pa10-GPGV	Vitis vinifera cultivar Chardonnay	France: Payenne, Champagne	2017	>560
MN458444	Grapevine Pinot gris virus	IFV72_Vau_A24	Vitis vinifera cultivar Grenache	France: Vauluse IFV	2017	>560
MN458445	Grapevine Pinot gris virus	IP-C522-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Carignan	France: IFV, Grau du roi	2017	>560
MN458446	Grapevine Pinot gris virus	IP-C522-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Carignan	France: IFV, Grau du roi	2017	>560
MN458447	Grapevine Pinot gris virus	IV2_IJ9-12	Vitis vinifera cultivar Sauvignon	France: Bordeaux	2015	>560
MN458448	Grapevine Pinot gris virus	IV4_I68-2-11	Vitis vinifera cultivar Gravesac	France: IFV, Grau du roi	2015	>560

MN458449	Grapevine Pinot gris virus	IV5_I76-1	Vitis vinifera cultivar Riparia Gloire de Montpellier	France: IFV, Grau du roi	2015	>560
MN458450	Grapevine Pinot gris virus	IV6_I69-4-2	Vitis vinifera cultivar 3309 Couderc 0144	France: IFV, Grau du roi	2015	>560
MN458451	Grapevine Pinot gris virus	IV6_I70-5-3	Vitis vinifera cultivar 101-14 MGT 0759	France: IFV, Grau du roi	2015	>560
MN458452	Grapevine Pinot gris virus	IV6_I73-2-3	Vitis vinifera cultivar 3309 Couderc 0143	France: IFV, Grau du roi	2015	>560
MN458453	Grapevine Pinot gris virus	IV7_F81	Vitis vinifera cultivar 3309 Couderc 0144	France: IFV, Grau du roi	2015	>560
MN458454	Grapevine Pinot gris virus	IV7_I78-2	Vitis vinifera cultivar 41B MGT	France: IFV, Grau du roi	2015	>560
MN458455	Grapevine Pinot gris virus	IV8_F82	Vitis vinifera cultivar 101-14 mgt 0759	France: IFV, Grau du roi	2015	>560
MN458456	Grapevine Pinot gris virus	IV8_F85	Vitis vinifera cultivar Cabernet Sauvignon	France: Bordeaux	2015	>560
MN458457	Grapevine Pinot gris virus	IV9_F83-2	Vitis vinifera cultivar Fercal	France: IFV, Grau du roi	2015	>560
MN458458	Grapevine Pinot gris virus	W22-GPGV1	Vitis vinifera cultivar Pinot Noir	France: Wettolsheim, Alsace	2017	>560
MN458459	Grapevine Pinot gris virus	W22-GPGV2	Vitis vinifera cultivar Pinot Noir	France: Wettolsheim, Alsace	2017	>560
MN458460	Grapevine Pinot gris virus	W25-GPGV	Vitis vinifera cultivar Pinot Noir	France: Wettolsheim, Alsace	2017	>560
MT272732	Grapevine Pinot gris virus	Clair	Vitis vinifera cv. Clairette	Algeria	2019	>552
MT141711	Grapevine Pinot gris virus	GPGV-Gr symptomatic	Vitis vinifera cv. Makripodia	Greece	1/6/19	>560
MW147697	Grapevine Pinot gris virus	isolate 2	Vitis	Czech Republic	1/9/20	>560
MW147699	Grapevine Pinot gris virus	isolate 4	Vitis	Czech Republic	1/9/20	>560
MW147700	Grapevine Pinot gris virus	isolate 5	Vitis	Czech Republic	1/9/20	>555
MW147701	Grapevine Pinot gris virus	isolate 6	Vitis	Czech Republic	1/9/20	>560
MW147703	Grapevine Pinot gris virus	isolate 8	Vitis	Czech Republic	1/9/20	>560
MW815134	Grapevine Pinot gris virus	GPGV-Gr-As	Agionitiko	Greece	12/7/05	>560
MZ220969	Grapevine Pinot gris virus	12G4110	grapevine		2,013	>560
MZ220971	Grapevine Pinot gris virus	16GVP002	grapevine		2016	>560
MZ344578	Grapevine Pinot gris virus	18GV A002b	grapevine		2018	>560
MZ344580	Grapevine Pinot gris virus	18GV A003b	grapevine		2018	>560
HC940503	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	w4	Vitis vinifera	Greece:Crete	1/6/12	6,988
KT965859	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	BN	Vitis vinifera	Italy	Desconocida	7,097
KY593994	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	B34	Vitis vinifera L.	Turkey	1/7/15	382
KY593995	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	B36	Vitis vinifera L.	Turkey	1/7/15	331
KY593996	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	B42	Vitis vinifera L.	Turkey	1/7/15	287

## Anexos

KY593997	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	B50	<i>Vitis vinifera</i> L.	Turkey	1/7/15	382
LN623574	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	PsiI8	<i>Vitis vinifera</i>	Greece	1/6/12	205
LN623575	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	Y12	<i>Vitis vinifera</i>	Greece	1/6/12	205
LN623576	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	E16	<i>Vitis vinifera</i>	Greece	1/6/12	205
LN624752	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	PsiI8	<i>Vitis vinifera</i>	Greece	1/6/12	730
LN624753	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	Y12	<i>Vitis vinifera</i>	Greece	1/6/12	717
LN624754	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	E16	<i>Vitis vinifera</i>	Greece	1/6/12	724
MF740760	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	F1-L1	<i>Ficus carica</i>	Iran: Fars	10/5/17	421
MF740761	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	K1-R1	<i>Ficus carica</i>	Iran: Kerman	20/5/17	421
MF740762	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	L1-K1	<i>Ficus carica</i>	Iran: Lorestan	5/6/17	421
MF740763	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	F2-E1	<i>Ficus carica</i>	Iran: Fars	15/6/17	421
MF740764	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	M1-B1	<i>Ficus carica</i>	Iran: Mazandaran	21-Apr-2017	421
MF740765	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	M1-S1	<i>Ficus carica</i>	Iran: Markazi	18-Apr-2017	421
MF740766	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	K1-P1	<i>Ficus carica</i>	Iran: Kermanshah	25-Apr-2017	410
MF740767	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	Kh1-M1	<i>Ficus carica</i>	Iran: Khorasan	16/7/17	421
MF991952	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	VLJ-178	<i>Vitis vinifera</i> cv. Ljutun	Croatia	1/7/13	7,157
MT783680	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	NV5	<i>Vitis vinifera</i>	South Africa	2019	7,09
NC_027131	Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	w4	<i>Vitis vinifera</i>	Greece-Crete	1/6/12	6,988
MZ344576	Grapevine asteroid mosaic associated virus	14G480	<i>Vitis vinifera</i>		2014	6,72

MT951234	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1737	freeliving Vitis spp	USA: Yates county, New York State	1/6/17	402
MT951233	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1783	freeliving Vitis spp	USA: Seneca county, New York State	1/6/17	402
MT951232	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1778	Vitis vinifera 'Cabernet franc'	USA: Seneca county, New York State	1/6/17	402
MT951231	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1784	freeliving Vitis spp	USA: Tompkins county, New York State	1/6/17	402
MT951230	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1725	freeliving Vitis spp	USA: Ontario county, New York State	1/6/17	402
MT951229	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1789	freeliving Vitis spp	USA: Tompkins county, New York State	1/6/17	402
MT951228	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1779	freeliving Vitis spp	USA: Seneca county, New York State	1/6/17	402
MT951227	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1723	freeliving Vitis spp	USA: Ontario county, New York State	1/6/17	402
MT951226	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1735	freeliving Vitis spp	USA: Yates county, New York State	1/6/17	402
MT951225	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1724	freeliving Vitis spp	USA: Ontario county, New York State	1/6/17	402
MT951224	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1727	freeliving Vitis spp	USA: Yates county, New York State	1/6/17	402
MT951223	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1782	freeliving Vitis spp	USA: Seneca county, New York State	1/6/17	402
MT951222	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1732	freeliving Vitis spp	USA: Yates county, New York State	1/6/17	402
MT951221	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1731	freeliving Vitis spp	USA: Yates county, New York State	1/6/17	402
MT951220	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1734	freeliving Vitis spp	USA: Yates county, New York State	1/6/17	402
MT951219	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1729	freeliving Vitis spp	USA: Yates county, New York State	1/6/17	402
MT951218	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1730	freeliving Vitis spp	USA: Yates county, New York State	1/6/17	402
MT951217	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1740	freeliving Vitis spp	USA: Yates county, New York State	1/6/17	402
MT951216	Grapevine asteroid mosaic associated virus	NY1772	freeliving Vitis spp	USA: Schuyler county, New York State	1/6/17	402

## Anexos

MT770919	Grapevine asteroid mosaic associated virus	TS7	Vitis vinifera cv. Tempranillo	Spain	1/7/19	417
MT770918	Grapevine asteroid mosaic associated virus	MS3	Vitis vinifera cv. Macabeo	Spain	1/7/19	417
MT770917	Grapevine asteroid mosaic associated virus	MS2	Vitis vinifera cv. Macabeo	Spain	1/7/19	417
MT770916	Grapevine asteroid mosaic associated virus	TS6	Vitis vinifera cv. Tempranillo	Spain	1/7/19	417
MT770915	Grapevine asteroid mosaic associated virus	TS5	Vitis vinifera cv. Tempranillo	Spain	1/7/19	417
MT770914	Grapevine asteroid mosaic associated virus	TS4	Vitis vinifera cv. Tempranillo	Spain	1/7/19	417
MT770913	Grapevine asteroid mosaic associated virus	TS3	Vitis vinifera cv. Tempranillo	Spain	1/7/19	417
MT770912	Grapevine asteroid mosaic associated virus	TS2	Vitis vinifera cv. Tempranillo	Spain	1/7/19	417
MT770911	Grapevine asteroid mosaic associated virus	MS1	Vitis vinifera cv. Macabeo	Spain	1/7/19	417
MT459830	Grapevine asteroid mosaic associated virus	TS1	Vitis vinifera cv. Tempranillo	Spain	jul-19	6,692
MK253012	Grapevine asteroid mosaic associated virus	16GVP031	vitus vinifera	France	2016	6,717
MH061349	Grapevine asteroid mosaic associated virus	GAMaV_uniss2	Vitis vinifera (grapevine)	Italy	1/8/16	6,204
MH061348	Grapevine asteroid mosaic associated virus	GAMaV_uniss1	Vitis vinifera (grapevine)	Italy	1/8/16	6,204
MF510406	Grapevine asteroid mosaic associated virus	GAMV-HUSZHU	grapevine cultivar Furmint	Hungary: Tokaj, Szegilong	1/5/14	406
MF510405	Grapevine asteroid mosaic associated virus	GAMV-HUEH	grapevine cultivar Furmint	Hungary: Tokaj, Erdobenye	1/5/14	403
MF510404	Grapevine asteroid mosaic associated virus	GAMV-HUSZHT	grapevine cultivar Furmint	Hungary: Tokaj, Szegilong	1/5/14	406
MF510403	Grapevine asteroid mosaic associated virus	GAMV-HUMP	grapevine cultivar Merlot	Hungary: Szekszard	1/4/14	406
MF510402	Grapevine asteroid mosaic associated virus	GAMV-HUCS	grapevine cultivar Pearl of Csaba	Hungary: Balaton	2014	406
MF510401	Grapevine asteroid mosaic associated virus	GAMV-HUPP	grapevine cultivar Cabernet Sauvignon	Hungary: Villany	1/4/14	406

MF510400	Grapevine asteroid mosaic associated virus	GAMV-HUHT	grapevine cultivar Chardonnay	Hungary: Neszemely	1/5/15	406
MF510399	Grapevine asteroid mosaic associated virus	GAMV-HUTK	grapevine cultivar Kekfrankos	Hungary: Sopron	1/5/14	406
KY123917	Grapevine asteroid mosaic associated virus	CS	Vitis vinifera; cultivar Cabernet Sauvignon	France	2015	6,72
KX354202	Grapevine asteroid mosaic associated virus	GV30	Vitis vinifera	USA	17/11/10	6,719
KU976280	Grapevine asteroid mosaic associated virus	93-26	Vitis vinifera cv. Syrah	Canada	25/11/14	467
KU976279	Grapevine rupestris vein feathering virus	93-21	Vitis vinifera cv. Syrah	Canada	25/11/14	389
FN555305	Grapevine asteroid mosaic associated virus	P	Vitis vinifera Pinot Noir ENTAV115			321
AJ249358	Grapevine asteroid mosaic associated virus	USA9	Vitis rupestris			575
AJ249357	Grapevine asteroid mosaic associated virus	USA9	Vitis rupestris			1,852
AB276378	Grapevine asteroid mosaic associated virus			Japan:Hiroshima		347
NC_011106	Grapevine virus E	TvAQ7	Vitis labruscana	Japan:Hiroshima	1/4/08	7,564
NC_011106	Grapevine virus E		Vitis labruscana	Japan:Hiroshima		7,564
MK490829	Grapevine virus E	D2-1/8	Vitis vinifera	Greece	Dec-2016	7,566
MK331711	Grapevine virus E	GVE-OH	grapevine	USA		7,53
MF991950	Grapevine virus E	VVL-101	Vitis vinifera cv. Vlasca	Croatia	Aug-2015	7,572
KF588015	Grapevine virus E	GFMG-1	grapevine	China	10-nov-12	7,571
JX402759	Grapevine virus E	WAHH2	Vitis vinifera L. cultivar Cabernet Sauvignon	USA	2,006	7,568
GU903012	Grapevine virus E	SA94	Vitis vinifera cv. Cabernet	South Africa	jul-09	7,568
AB432910	Grapevine virus E		Vitis labruscana cv. Aki Queen OKY-AQ7	Japan: Hiroshima		7,564
NC_035203	Grapevine virus T	Cho	Vitis vinifera; Teroldego	Italy	8,701	sept-15
NC_018458	Grapevine virus F	AUD46129	Vitis sp.	USA	7,551	01-Jan-2011
JX105428	Grapevine virus F	Vitis sp.	USA	7,551	01-Jan-2011	AUD46129
KP114220	Grapevine virus F	Vitis vinifera cv. Chenin blanc	South Africa: Vredendal, Western Cape province	7,547	19-feb-14	V5
LC617946	Grapevine virus F	Vitis sp.	Japan:Hiroshima, Higashihiroshima, Akitsu	7,674	2020-10	

## Anexos

LC617947	Grapevine virus F	Vitis sp.	Japan:Hiroshima, Higashihiroshima, Akitsu	7,5	2020-10	
MK490830	Grapevine virus F	Vitis vinifera	Greece	7,502	Dec-2016	D2-1/9
MK490831	Grapevine virus F	Vitis vinifera	Greece	7,501	Dec-2016	D2-1/13
MZ291908	Grapevine virus F	grapevine		7,531	2,016	16SP029
NC_018458	Grapevine virus F	Vitis sp.	USA	7,551	01-Jan-2011	AUD46129
JF301669	Grapevine vein clearing virus	grapevine (Chardone)l	USA	7,753	jun-10	LBC0903
KJ725346	Grapevine vein clearing virus	Vitis rupestris	USA	7,755	jun-12	
KT907478	Grapevine vein clearing virus	Vitis rupestris	USA	7,725	Aug-2014	VRU2
KX610316	Grapevine vein clearing virus	Ampelopsis cordata	USA	7,749	21-jun-15	AMP1
KX610317	Grapevine vein clearing virus	Ampelopsis cordata	USA	7,765	15-may-14	AMP2
MH319693	Grapevine vein clearing virus	Grapevine cv. Chardone)l	USA	7,742	16-jun-16	CHAA2
MH319694	Grapevine vein clearing virus	Ampelopsis cordata	USA	7,742	16-jun-16	AMP3
NC_015784	Grapevine vein clearing virus	grapevine (Chardone)l	USA	7,753	jun-10	LBC0903
KU821056	Grapevine red blotch virus	Vitis vinifera	South Korea	3,207	22-jul-14	SW6
KY316022	Grapevine red blotch virus	Vitis vinifera cv. Cabernet franc	Canada	3,205	23-sept-15	ONRB4
KY316023	Grapevine red blotch virus	Vitis vinifera cv. Cabernet franc	Canada	3,207	23-sept-15	ONRB5
MH476297	Grapevine red blotch virus	Vitis vinifera cv. Marechal Foch	Canada	3,205	20-sept-16	NSRB4
MH476300	Grapevine red blotch virus	Vitis vinifera cv. New York Muscat	Canada	3,206	20-sept-16	NSRB7
MH476301	Grapevine red blotch virus	Vitis vinifera cv. Pinot Noir	Canada	3,207	20-sept-16	NSRB8
MH557095	Grapevine red blotch virus	Vitis vinifera Nebbiolo	Mexico	3,209	2,017	Guadalupe-JCT
MK928382	Grapevine red blotch virus	Vitis vinifera	USA: Idaho	3,205	23-sept-14	GRBV_ID13_Syrah_2014
MK928386	Grapevine red blotch virus	Vitis vinifera	USA: Idaho	3,206	19-oct-11	GRBV_IDA8_Syrah_h_2011
MNI86404	Grapevine red blotch virus	Vitis vinifera cv. Merlot	USA	3,206	2,018	MWC#166
NC_022002	Grapevine red blotch virus	Vitis vinifera	USA	3,206	10-sept-10	CF214-1