



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agrònica i del Medi Natural

# Desarrollo de plataformas diagnósticas para la detección de virus patógenos en la vid

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO 2017/2018

**Autora:**

Sara Gómez Jiménez

**Tutora:**

Dra. María del Remedio Albiach Martí

**Cotutor:**

Alejandro Carralero González

**Tutor académico:**

Carmelo López del Rincón



*En Valencia a 9 de Julio de 2018*



**Título:** Desarrollo de plataformas diagnósticas para la detección de virus patógenos en la vid

## RESUMEN

España es el segundo país en cuanto a área agrícola cultivada en la Unión Europea y se posiciona como el primer país con superficie de viñedo a nivel mundial, con más de novecientas mil hectáreas cultivadas en toda la península. Por lo tanto, el sector vitivinícola español tiene gran relevancia a nivel mundial.

La normativa de la Unión Europea obliga a la regulación fitosanitaria de los productos vegetales que son introducidos en los países miembros. La legislación española, así mismo, prohíbe la introducción y propagación en el país de virus y organismos afines, infecciosos para variedades de *Vitis*, y obliga al control de aquellos fitopatógenos sobre los que ya se tiene constancia. Por lo que es necesario controlar los patógenos que afectan a estos cultivos a fin de evitar pérdidas de producción y de calidad del producto vegetal final. En este sentido, los virus de mayor relevancia económica para el cultivo de la vid son *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Raspberry ringspot virus* (RPRSV), *Arabis mosaic virus* (ArMV) y *Tomato black ring virus* (TBRV).

En este proyecto, se pretende desarrollar una metodología de PCR para la detección múltiple de los principales virus que afectan a vid, anteriormente mencionados, en una misma muestra vegetal. Para ello se diseñaron cebadores específicos de regiones conservadas entre cepas de la misma especie viral, como son los genes que codifican para las proteínas de la cápsida, así como sondas específicas de cada especie viral marcadas con diferentes fluoróforos. De este modo, se diseñaron “in silico” parejas de cebadores que teóricamente pudieran amplificar en base a sus características moleculares (porcentaje de citosina y guanosina, formación de homodímeros y heterodímeros...) y, además, se establecieron las condiciones de reacción de PCR óptimas. Una vez elegidos los cebadores y las condiciones de la PCR-multiplex ideales, se procedió a realizar las pruebas experimentales con los controles (positivo, negativo, de la extracción del ARN) para optimizar todo el proceso. En una última fase, se aplicó la metodología desarrollada al análisis fitopatológico de muestras vegetales de campo, procedentes de diferentes lugares y variedades de vid, para comprobar que la metodología funcionaba adecuadamente.

El objeto del presente proyecto es, por tanto, el desarrollo de una tecnología de PCR-multiplex para el análisis de los principales virus patógenos de la vid. Con el fin de diagnosticar su presencia una misma muestra, reduciendo el número, coste y tiempo de los análisis y así mejorar las técnicas de diagnóstico, detección y saneamiento empleadas en ValGenetics SL.

### **Palabras clave:**

*Vitis*, virus, RT-qPCR, multiplex, detección, diagnóstico.

**Autora:** Sara Gómez Jiménez

**Tutor académico:** Carmelo López del Ricón

**Tutora:** María del Remedio Albiach Martí

**Cotutor:** Alejandro Carralero González

**Title:** Development of diagnostic platforms for the analysis of phytopathogenic viral species infecting grapevine

## ABSTRACT

Spain is the second country with highest agricultural cultivated area in the European Union and it is positioned as the first country in large cultured vineyard surface worldwide, with more than nine hundred thousand hectares cultivated. Therefore, the Spanish wine sector is economically important at international level.

The phytosanitary directive of the European Union controls the sanitary state of plant products that are introduced in or move between the member countries. The Spanish law also prohibits the introduction and spread of phytopathological viruses and other infectious organisms in *Vitis*, thus it forces to the control of those viral species. In this way, it is necessary to detect these pathogenic viruses in order to avoid losses in grape production and in the final product quality. On this regard, the viruses of major economic relevancy infecting grapevine varieties are *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Strawberry latent ring spot virus* (SLRSV), *Raspberry ringspot virus* (RPRSV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV) and *Tomato black ring virus* (TBRV).

To reduce the number, cost and time of analysis, there is a need in detecting several viruses in a single genetic analysis. In this project, three PCR-multiplex tests have been developed in order to detect the above indicated principal grapevine viral species. For this aim, specific primers of conserved genomic regions, like capsid protein coding genes, were designed, as well as specific TaqMan probes, labeled with different dyes, targeting each of the viral species studied. Each couple of primers, was designed on the basis of its molecular characteristics (percentage of cytosine and guanine, self-dimers and hetero-dimer formation...) and the optimum PCR conditions were tested "in silico". Once the primers sequences and the optimum PCR-multiplex conditions were established, the experimental PCR-multiplex tests were initially performed with controls (positive, negative and ARN extraction) to optimize the whole analytical process. Afterwards, the developed PCR-multiplex methodology was applied for the analysis of field samples from different places and distinct varieties of grapevine, to verify the methodology.

The objective of the present project is, therefore, the development of a PCR-multiplex's technology to analyse the most important viruses affecting grapevine in three single analyses. In this work sampling, number, cost and time of the phytopathological analyses could be reduced and the diagnostic technologies and detection in plant sanitation experiments applied in ValGenetics SL improved.

**Key words:**

*Vitis*, virus, RT-qPCR, multiplex, detection, diagnostic.

## **AGRADECIMIENTOS**

A ti Reme, por abrirme las puertas de ValGenetics y permitirme realizar este Proyecto, en el que tanto he aprendido y sobre todo por haberme dejado formar parte de tu gran equipo.

A vosotros compañeros de Valgenetics, Pilar, Magda, Montse, Rosi, Ana, Juanjo, por hacerme sentir parte de esa gran familia que habéis formado. A ti Ana, por ayudarme y regalarme tu tiempo. Y sobre todo a ti, Alejandro, por aceptarme como tu primera pupila, por toda la ilusión que has puesto en este proyecto y por guiarme en cada paso desde el primer día que entré en la empresa. Gracias, muchas gracias por todo.

A ti, Edu, darme siempre los mejores consejos, orientarme y ayudándome a lograr mis objetivos durante los cuatro años de carrera. Y a ti Carmelo, por tutorarme y estar siempre disponible.

A mis biotecnólogas, por darle sentido a eso de que los amigos son la familia que se elige. A ti Gema, por cruzarte en mi camino el primer día de universidad y no haberme dejado desde entonces. A ti Begoña, por ayudarme a ver una parte de mí que no conocía. A ti María, por tener siempre la mejor palabra en el peor momento. A ti Paula, tan buena, tan dulce, tan tú. A ti Suzanne, por dejarme cuidarte y por cuidarme. Y a ti Ana, mi confidente, mi gran apoyo.

A vosotras, Vero y Ángela, pilares fundamentales de mi vida.

A mis padres y a mi hermana, que siempre han confiado en mí, ya que sin ellos no habría podido llegar hasta aquí.

A ti abuela, a quien quiero dedicar este proyecto, por todo lo que me has enseñado, por animarme a luchar por mis sueños y por hacerme ver lo lejos que puedo llegar.

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	El sector vitivinícola y los principales organismos patógenos virales que lo afectan... 1	
1.2.	Control de los virus fitopatogénicos en la vid y métodos de diagnóstico .....	7
2.	OBJETIVOS .....	11
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
3.1.	Material vegetal.....	12
3.1.1.	Material vegetal infectado con cepas tipo .....	12
3.1.2.	Material vegetal de campo .....	12
3.2.	Extracción de ácidos nucleicos .....	12
3.3.	Diseño de cebadores y sondas.....	13
3.4.	RT-PCR convencional.....	14
3.5.	RT-PCR a tiempo real (RT-qPCR) .....	14
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1.	Material vegetal y extracción de ácidos nucleicos .....	17
4.2.	Diseño de cebadores y sondas.....	17
4.3.	RT-PCR convencional.....	19
4.3.1.	Prueba experimental de los cebadores.....	19
4.3.2.	RT-PCR convencional multiplex .....	20
4.4.	RT-PCR a tiempo real (RT-qPCR) .....	21
4.4.1.	RT-qPCR con SYBR-Green.....	21
4.4.2.	RT- qPCR singleplex .....	23
4.4.3.	RT- qPCR multiplex.....	25
4.5.	Comparación de las tecnologías desarrolladas.....	28
4.6.	Pruebas de sensibilidad .....	29
4.7.	Aplicación de la tecnología a material de campo y validación .....	30
5.	CONCLUSIONES .....	33
6.	REFERENCIAS .....	34
7.	ANEXOS.....	39
	ANEXO 1. Resultados de las pruebas con material de campo.....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Resumen de las principales características de cada uno de los virus que son objeto del presente proyecto.

**Tabla 2.** Cepas tipo de colección utilizadas como controles positivos de PCR.

**Tabla 3.** Información sobre las sondas asociadas a cada virus: fluoróforo, longitud de onda de emisión ( $\lambda$ ) en nanómetros, el sistema de bloqueo y el grupo multiplex, diferenciado por colores.

**Tabla 4.** Características de los cebadores utilizados para la detección de cada uno de los virus recogidos en el presente proyecto y del control interno COX.

**Tabla 5.** Programas de reacción de RT-qPCR multiplex para cada uno de los grupos.

**Tabla 6.** Cóctel de reacción optimizado para cada reacción de RT-qPCR singleplex (izquierda) y multiplex (derecha).

**Tabla 7.** Programa de reacción para cada RT-PCR convencional y RT-qPCR multiplex.

**Tabla 8.** Comparación de los valores de  $C_t$  obtenidos para la detección de cada virus de forma individual o en conjunto.

**Tabla 9.** Comparación de las técnicas de RT-PCR multiplex convencional y en tiempo real desarrolladas para el grupo 1 (GLRaV-3, GFLV, GFkV).

**Tabla 10.** Comparación de las técnicas de RT-PCR multiplex convencional y en tiempo real desarrolladas para el grupo 3 (GLRaV-1, GLRaV-2, SLRSV).

**Tabla 11.** Resultados de las pruebas con material de campo por RT-PCR convencional y multiplex con los cebadores del grupo 1 (GLRaV-3, GFLV y GFkV)

**Tabla 12.** Resultados de las pruebas con material de campo por RT-PCR convencional y multiplex con los cebadores del grupo 2 (GLRaV-1, GLRaV-2 y SLRSV).

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Resultados de RT-PCR convencional para cada pareja de cebadores, con tres reacciones por pareja: dos controles positivos y uno negativo.

**Figura 2.** Resultados del multiplexado por RT-PCR convencional de los grupos 1 y 2.

**Figura 3.** Curvas amplificación (izquierda) y de melting o disociación (derecha) de GFkV (arriba) y de GLRaV-2 (abajo).

**Figura 4.** Curvas amplificación (A, C, E) y de melting (B, D, F)) de los virus del grupo 3: ArMV (A, B), TBRV (C, D) y RPRSV (E, F).

**Figura 5.** Resultados de RT-qPCR para GFLV utilizando una concentración final de cebadores de 100 nM y un gradiente de concentración de sonda, representado en diferentes colores (leyenda).

**Figura 6.** Gráficas de amplificación en las que se muestra el resultado final de las reacciones de RT-PCR multiplex para cada grupo.

**Figura 7.** Curvas de amplificación obtenidas para cada uno de los virus del grupo 1 en las diluciones seriadas de factor 10 de los controles positivos.

**Figura 8.** Fotografías del material vegetal con sintomatología típica de la enfermedad el entrenudo corto utilizado para testar las tecnologías de diagnóstico desarrolladas en este proyecto.



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>ArMV</b>	<i>Arabidopsis mosaic virus</i>
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino
<b>cADN</b>	ADN complementario
<b>C<sub>t</sub></b>	Ciclo de cuantificación (threshold cycle)
<b>dRn</b>	Fluorescencia de la sonda reportera
<b>dsADN</b>	ADN de doble hebra ( <i>Doble strain DNA</i> )
<b>dsARN</b>	ARN de doble hebra ( <i>Doble strain RNA</i> )
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>EPPC</b>	European and Mediterranean Plant Protection Organization
<b>GFkV</b>	<i>Grapevine fleck virus</i>
<b>GFLV</b>	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
<b>GLD</b>	Enfermedad del rizado de la hoja en viña ( <i>Grapevine Leafroll Disease</i> )
<b>GLRaV-1</b>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>
<b>GLRaV-2</b>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i>
<b>GLRaV-3</b>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>
<b>GVA</b>	<i>Grapevine virus A</i>
<b>GVB</b>	<i>Grapevine virus B</i>
<b>ICVG</b>	<i>International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine</i>
<b>INE</b>	<i>Instituto Nacional de Estadística</i>
<b>MAPAMA</b>	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
<b>mARN</b>	ARN mensajero
<b>MN</b>	Nucleospin RNA plant de Macherey-Nagel kit
<b>MW</b>	Maxwell RSC Plant RNA kit
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimera ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RPRSV</b>	<i>Raspberry ringspot virus</i>
<b>RT-PCR</b>	PCR con transcriptasa reversa
<b>RT-qPCR</b>	PCR con transcriptasa reversa a tiempo real o cuantitativa
<b>SLRSV</b>	<i>Strawberry Latent Ringspot Virus</i>
<b>ssADN</b>	ADN de hebra doble ( <i>Single strain DNA</i> )
<b>ssARN</b>	ARN de hebra simple ( <i>Single strain RNA</i> )
<b>TBRV</b>	<i>Tomato black ring virus</i>
<b>λ</b>	Longitud de Onda

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El sector vitivinícola y los principales organismos patógenos virales que lo afectan

El sector vitivinícola tiene gran importancia en España debido tanto a su valor económico como cultural y medioambiental. Según el INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA, 2017, España es el segundo país de la Unión Europea por número de superficie agrícola, entre las que 957.573 has pertenecen a cultivo de viñedo tal y como muestran los últimos datos del Registro Vitícola (MAPAMA, 2013). La FEDERACIÓN ESPAÑOLA DEL VINO, considera España el primer viñedo a nivel mundial, alcanzando en 2013 una producción récord de 52.5 millones de hectolitros de vino y mosto.

Los últimos datos publicados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA), señalan que el sector del mosto y el vino supone el 8.02% de la Producción Vegetal y casi el 4.8% de la Producción de la Rama Agraria. La mano de obra que genera el cultivo de vid se aproxima a 18 millones de jornales. Además, entorno al 10% del vino que se exporta a nivel mundial procede de España, destinándose principalmente a países de la Unión Europea (71%), aunque también son importantes las exportaciones internacionales: Rusia (5% del total), Estados Unidos (4%) y China (3%).

Existen gran cantidad de factores que pueden influir en la elaboración de vinos y mosto y en la producción de uva de mesa, siendo imprescindible un correcto estado sanitario de las cepas para conseguir una buena producción (Crespo, Carralero, Plomer, Cervera, & Albiach, 2015).

Con el objetivo de asegurar el estado sanitario del material vegetal, la Unión Europea regula la introducción de material vegetal en su territorio mediante la DIRECTIVA 2000/29/CE, adaptada a la legislación española por el REAL DECRETO 58/2005. Así mismo la LEY 43/2002 de 20 de noviembre, de sanidad vegetal, por la que se establecen la normativa básica y las normas de coordinación en materia de sanidad vegetal, tiene entre sus fines proteger el material vegetal de los daños producidos por los patógenos y las plagas, y de la introducción y propagación de los organismos de cuarentena, así como garantizar que los medios de defensa fitosanitaria sean útiles, eficaces y seguros. En este sentido y en relación con el cultivo de vid, que es el que ocupa el presente proyecto, se recogen en el Real Decreto 58/2005 de 21 de enero los virus afines a *Vitis* cuya introducción y propagación deben prohibirse en el entorno europeo. De todos ellos, en el siguiente proyecto se propone una técnica para el análisis de *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV), *Strawberry latent ring spot virus* (SLRSV), *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 virus A* (GVA) y *Grapevine virus B* (GVB).

Según el *INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE* (ICVG), la vid es uno de los cultivos para el que más agentes infecciosos se han descrito, con más de 70 entre virus, viroides, fitoplasmas y bacterias, siendo los virus el grupo más numeroso (66). Gran parte de estos patógenos producen enfermedades que afectan negativamente al vigor de la planta y a su longevidad, así como al rendimiento y la calidad del fruto. Los más virulentos pueden llegar incluso a colapsar las plantas.

Todos los virus patógenos de vid anteriormente mencionados pertenecen a al grupo IV de la Clasificación de Baltimor, pues su genoma es de ARN de cadena simple y sentido positivo (Baltimore, 1971). Estos virus tienen, en su mayoría, una distribución global o al menos están presentes en varios continentes, lo que podría explicarse por el tráfico de material infectado así como de sus vectores transmisores (Bruissson et al., 2017).

En cuanto a su clasificación taxonómica (Tabla 1), cuatro de ellos (GFLV, ArMV, TBRV y RpRSV) pertenecen a la familia *Secoviridae*, poco variable a nivel serológico (Martelli, 2014), y

al género *Nepovirus*, uno de los géneros que mayor impacto económico generan en Europa, sobre todo en la zona mediterránea (Martelli, 2014). SLRSV, pertenece a la misma familia que los anteriores (*Secoviridae*), pero existe discrepancia en cuanto a su clasificación dentro del género *Nepovirus*. GFkV es un *Maculavirus*, dentro de la familia *Tymoviridae*. GLRaV-1, 2 y 3 se clasifican dentro de la familia *Closteroviridae*, siendo GLRaV-1 y -3 *Ampelovirus* y -2 *Closterovirus*. GVA y GVB son *Vitivirus*.

A continuación, se describen más detalladamente cada uno de ellos, resumiendo sus principales características en la Tabla 1.

### ***Grapevine fanleaf virus (GFLV)***

GFLV produce la enfermedad del entrenudo corto, una de las más extendidas en los cultivares de vid de todo el mundo, y por tanto muy importante desde el punto de vista económico (Digiario, Elbeaino, & Matelli, 2017). Aunque el grado de severidad de los síntomas inducidos en planta, varía según la resistencia que presenta cada cultivar, en el caso de las variedades sensibles los efectos son devastadores, llevando a enormes pérdidas de calidad y vida útil del fruto, bajos rendimientos de producción, y menor tolerancia de la planta afectada a cambios ambientales (Martelli, 2014).

La sintomatología se basa la presencia de malformaciones, mosaicos y bandeado. Las malformaciones aparecen a principios de primavera y afectan a las hojas, los tallos y al tamaño de la planta, siendo la más destacada, como su propio nombre indica, los entrenudos cortos. Los mosaicos son amarillos y de aspecto variable (puntos, anillos o líneas) y aparecen también a principios de primavera, en las partes vegetativas de la planta y en las inflorescencias. El bandeado solo aparecen en caso de coinfección de GFLV con *Grapevine yellow speckle viroids*, y son unas manchas amarillas que aparecen a mediados de verano en las venas de las hojas maduras y acaban invadiéndola (Digiario et al., 2017; Martelli, 2014)

En general, todas las variedades de *Vitis vinifera* son susceptibles de ser infectadas por GFLV, aunque los niveles de resistencia/tolerancia varían entre ellas (Martelli, 2014). Además, se puede encontrar en diferentes plantas herbáceas y hortícolas, como: *Nicotiana tabacum*, *Chenopodium sp.*, *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus*, etc (EPPO, 2018).

GFLV pertenece al subgrupo A dentro del género *Nepovirus*, caracterizado por ser bipartito, con viriones de un diámetro de 30 nm, una cápsida de 54 kDa y un genoma formado por dos moléculas de ARN, cada una codificando una sola ORF (Digiario et al., 2017).

El vector transmisión del virus es un nematodo, *Xiphinema index*, que se alimenta de las raíces de la planta de vid, también se puede transmitir de forma mecánica, por polen o por semilla (Brown, Trudgill, & Robertson, 1996; Martelli, 2014)

### ***Arabis mosaic virus (ArMV)***

ArMV se ha detectado en cultivos de vid de diferentes países europeos, como España, Francia, Italia o Rumania, así como en Canadá, Estados Unidos, Asia, África y Japón (Digiario et al., 2017; Martelli, 2014).

La sintomatología es variable, produciendo gran deterioro vegetal, moteados y mosaicos, retraso del crecimiento y malformaciones. Las cepas virales más virulentas pueden ocasionar incluso al colapso de la planta. Dado que suele aparecer en coinfección con otros virus resulta difícil de asignar una sintomatología específica a este virus (Murant & Taylor, 1965). (EPPO, 2018) (Martelli, 2014)

Este virus presenta un amplio espectro de hospedadores, ya que afecta a 93 especies de dicotiledóneas de 28 familias diferentes, incluidas variedades silvestres (Digiario et al., 2017). Los huéspedes más relevantes según datos de la EPPO son las fresas (*Fragaria*), el lúpulo (*Humulus*), *Vitis spp.*, la frambuesa (*Rubusidaeus*), *Rheum spp.* y *Sambucusnigra* (EPPO, 2018).

ArMV contiene unos viriones y genoma de características muy similares a GFLV (Martelli, 2014; Wetzel, Meunier, Jaeger, Reustle, & Krczal, 2001).

El vector transmisor de ArMV son los nematodos de la especie *Xiphinema diversicaudatum*. Sin embargo, no puede ser transmitido por el vector de GFLV, *X. index*, debido a compatibilidades de una proteína de la cápsida (Marmonier et al., 2010; Martelli, 2014).

### **Tomato black ring virus (TBRV)**

Existe constancia de la presencia de TBRV en los cinco continentes, ya que está presente en toda Europa, India, Japón, Kenia, América del Norte y Brasil.

Entre los síntomas producidos por TBRV cabe destacar una gran disminución del rendimiento de cultivo y la falta de vigor y crecimiento. Produce patrones de puntos, líneas y anillos cloróticos en las hojas de nueva infección. Los síntomas varían entre huéspedes y son más claros al principio de primavera y disminuyendo en verano, cuando el crecimiento es más rápido (EPPO, 2018).

Afecta a otras especies además de viña (EPPO, 2018), un total de 76 especies de 29 familias, tanto mono como dicotiledóneas, árboles frutales, pequeñas especies frutales, hortalizas, ornamentales e incluso especies silvestres (Digiario et al., 2017)

El genoma de este virus está formado por dos moléculas de ARN de cadena simple encapsidadas de forma independiente en una cápsida de 57 kDa. Esta cápsida está formada por un tipo único de subunidades por lo que se clasifica dentro del subgrupo B dentro de los *Nepovirus* (Jończyk, Le Gall, Patucha, Borodynko, & Pospieszny, 2004).

Las distintas cepas del virus son transmitidas por diferentes especies de vectores, destacando *Lepidolamprologus elongatus* y *Lepidolamprologus. attenuatus* (EPPO, 2018). La transmisión por semilla no es muy relevante en viña, pues se propaga de forma vegetativa con un porcentaje más elevado. Sin embargo, es importante en el caso de malas hierbas y arbustos situados alrededor de las viñas, pues son reservorios virales de RpRSV y TBRV (Murant & Taylor, 1965).

### **Raspberry ringspot virus (RpRSV o RRSV)**

RpRSV se distribuye geográficamente por la Unión Europea en general y en algunas regiones de Asia, como Kazakstán, Rusia y Turquía (EPPO, 2018).

La sintomatología de RpRSV en vid es similar a la inducida por la enfermedad del entrenudo corto, pudiendo ser confundidos con los síntomas severos de GFLV. Los síntomas inducidos son moteados cloróticos y malformaciones asimétricas en hojas (Digiario et al., 2017) y enanismo en la planta (Credi et al. 1981).

El principal huésped de este virus es la frambuesa, aunque también son susceptibles otros frutos rojos como las fresas y las cerezas. Afecta también a plantas monocotiledóneas y a 14 familias de dicotiledóneas, entre las que destaca el género *Vitis*.

La variabilidad de RpRSV a nivel serológico es más elevada que para otros *Nepovirus* como GFLV (Wetzel et al., 2006). El genoma viral RpRSV es similar al del resto de *Nepovirus* del subgrupo A, con las dos moléculas de ARN encapsidadas de forma independiente (Digiario et al., 2017).

Este virus tiene como vectores transmisores tres especies de nemátodos de la familia *Longidoridae*: *Lepidolamprologus macrosoma*, *L. elongatus* y *Paralongidorus maximus*. Dependiendo de la cepa viral puede transmitirse también de forma mecánica y por semilla (más del 50% de la filogenia) (EPPO, 2018).

### ***Strawberry Latent Ringspot Virus (SLRSV)***

SLRSV es uno de los *Nepovirus* que menos impacto económico produce (EPPO, 2018). Está presente en Europa (zona mediterránea y oriente medio) sobre todo en España, Italia, Alemania, Grecia y Portugal. También se ha descrito en América, Nueva Zelanda, Asia y África, afectando a otras especies además de viña (Digiario et al., 2017).

Entre la sintomatología producida por este virus, cabe señalar que la infección es latente en fresa y otros frutales (EPPO, 2018). Sin embargo, en algunas ocasiones produce una gran disminución del rendimiento de cultivo y pueden aparecer malformaciones asimétricas, moteado clorótico y retraso del crecimiento (Digiario et al., 2017).

SLRSV infecta a un amplio espectro de hospedadores, 126 especies de 27 familias, entre los que cabe señalar a las plantas de frutos rojos como la fresa y la frambuesa (Digiario et al., 2017). Se ha visto que puede afectar también a otras especies como la cereza, la **viña** o los guisantes, así como a plantas ornamentales (rosales, narcisos, gladiolos, etc.) (EPPO, 2018).

La proteína de la cápsida está formada por dos tipos de subunidades, de 27 y 43 kDa. Presenta un genoma bipartito con características similares a virus de los géneros *Cheravirus*, *Fabavirus*, *Comovirus* y *Sadwavirus* lo que dificulta su clasificación y lo hace único (Tzanetakis, Postman, Gergerich, & Martin, 2006).

SLRSV puede ser transmitido de forma mecánica a herbáceas y de forma natural por el vector *X. diversicaudatum* a corta distancia (EPPO, 2018). *X. diversicaudatum* también es vector de ArMV, lo que hace que suelen aparecer en coinfección (Brown et al., 1996). También se han descrito casos de transmisión por semilla. La propagación vegetativa puede haber sido principal causa de su dispersión, pues la migración por el suelo del vector es muy lenta (EPPO, 2018).

### ***Grapevine fleck virus (GFkV)***

Este virus está distribuido por todo el mundo (Martelli, 2014; Sabanadzovic, Aboughanem-Sabanadzovic, & Martelli, 2017; Sabanadzovic, Ghanem-Sabanadzovic, Saldarelli, & Martelli, 2001), y es muy importante en Australia (Constable & Rodoni, 2011).

La infección por GFkV es latente en las variedades europeas y en la mayoría de los patrones americanos, aunque puede ocasionar incompatibilidades en el injerto. Los síntomas que aparecen en el caso *Vitis rupestris*, que es de las pocas variedades de vid sensibles a este virus, son puntos translúcidos en las hojas jóvenes debidos al clareado de las venas de tercer y cuarto orden. Las hojas más afectadas pueden rizarse, arrugarse o retorcerse. Las cepas víricas más agresivas pueden retrasar el crecimiento y dar lugar a raíces pobres. La infección se correlaciona con pérdidas de calidad y rendimiento del fruto cuando se encuentra en coinfección con otros virus (Constable & Rodoni, 2011; Martelli, 2014; Sabanadzovic et al., 2017). Como consecuencia de la infección las mitocondrias de las células vegetales se convierten en ‘cuerpos multivascuales’ en los que se replica el virus (Martelli, 2014).

Como hospedadores, al contrario de los virus mencionados anteriormente, solo se han descrito *Vitis ssp.* (Sabanadzovic et al., 2017).

En cuanto al genoma, GFkV está formado por una única molécula de ARN, poliadenilada en el extremo 3' y con alto contenido en citosinas en 5'. Se expresa como un precursor poliproteico que tras ser procesado da lugar las proteínas implicadas en las funciones virales (Sabanadzovic et al., 2001).

GFkV es un virus limitado al floema, que no se puede transmitir de forma mecánica y se trasfiere por propagación vegetativa de material infectado o por injerto, pues aún no se ha confirmado la existencia de ningún vector transmisor (Constable & Rodoni, 2011; Sabanadzovic et al., 2017). Igualmente, no se han descrito casos de transmisión herbácea ni por semilla (Sabanadzovic et al., 2017).

### ***Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)***

La aparición de GLRaV-1 se asocia con la de *V. vinifera* (Habili, Komínek, & Little, 2007). Produce la enfermedad del enrollamiento, considerada una de las más complejas y con mayor impacto económico en el cultivo de vid (Martelli, 2014) ya que afecta a viñedos distribuidos por todo el mundo (Martelli, 2014).

Como su propio nombre indica, los síntomas principales que aparecen en las plantas infectadas por GLRaV-1 se corresponden enfermedad del rizado de la hoja (*Grapevine leafroll disease* o GLD). Cabe señalar que la severidad de los síntomas en las plantas infectadas por este virus depende del cultivar. Además del enrollamiento de los bordes de las hojas a finales de otoño, en los cultivares de uva negra aparece una coloración rojiza de las zonas interveiales, mientras que las venas principales se mantienen verdes. Sin embargo, los cultivares de uva blanca muestran clorosis suave que a veces se confunde con el amarilleado típico de otoño, época en la que aparecen los síntomas. Por el contrario, los patrones americanos son asintomáticos (Martelli, 2014; Naidu, 2017). En el fruto se produce un retraso de la maduración que resulta en una disminución de contenido en azúcares (Habili et al., 2007).

El genoma de esta familia de virus se divide en dos bloques, uno de los cuales (QGB), exclusivo de *Closteroviridae*, codifica para HSP-70, una proteína de choque térmico (Habili et al., 2007). Contiene 10 ORFs y dos regiones no codificantes en los extremos 3' y 5' respectivamente. Existe gran variabilidad genética entre cepas del mismo virus, sobre todo en los genes CPd2, lo que se puede explicar por las diferentes presiones de selección dependiendo del cultivar y del vector (Naidu, 2017).

Existen un gran número de vectores transmisores de este virus, desde insectos como los *Pseudococcidae* y los *Coccidae*, cuya capacidad de transmitir el virus varía dependiendo de si está solo o en coinfección con otros virus (Habili et al., 2007). La transmisión a largas distancias, se produce normalmente, a través de material infectado (Naidu, 2017).

### ***Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2)***

Existe constancia de la presencia de GLRaV-2 en todas las áreas del mundo en las que hay cultivos de vid (Europa, América, África, Asia y Australia) (EPPO, 2018).

Los síntomas que produce GLRaV-2 son más leves que los que producen GLRaV-1 y -3 y varían entre las diferentes cepas. Solo aparecen de forma claramente distinguible entre plantas sanas y enfermas a finales de la etapa vegetativa. Las hojas se enrollan ligeramente y adquieren una tonalidad granate. Además, la presencia del virus implica incompatibilidad en la zona del injerto de la variedad con el patrón (Bertazzon, Borgo, Vanin, & Angelini, 2010).

Puede afectar a cualquier cultivo *V. Vinifera*, a los porta injertos, a híbridos interespecíficos e incluso en *Vitis ssp.* salvajes (Martelli, 2014).

Su genoma está formado por una única hebra de ARN de sentido positivo con una caperuza en 5' y sin poli-A en 3'. Codifica para 9 ORFs, con una estructura peculiar en cuanto a número y distribución espacial de los genes (Zhu, Ling, Goszczynski, McFerson, & Gonsalves, 1998) muy parecida a la de *Beet yellows virus* (BYV), *Beet yellow stunt virus* y *Citrus tristeza virus*, lo que ha llevado a clasificarlo dentro del género *Clorterovirus*. Dentro de la especie se han encontrado multitud de cepas con diferentes características biológicas y morfológicas (Angelini, Aboughanem-Sabanadzovic, Dolja, & Meng, 2017; Bertazzon et al., 2010).

No se ha descrito ningún insecto vector, aunque es probable que exista algún pulgón transmisor. Se puede transmitir de forma mecánica a huéspedes herbáceos, al contrario que los otros GLRaVs. Además puede transmitirse a través de injertos, siendo los patrones asintomáticos la principal vía de transmisión (Angelini et al., 2017).

### ***Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)***

GLRaV-3 es uno de los principales virus patógenos de vid, considerado por algunos autores, el virus de mayor impacto económico de todos los que afectan a vid (Maree et al., 2013; Naidu, 2017) y el principal agente etiológico causante de la enfermedad del enrollamiento de la vid (Burger, Maree, Gouveia, & Naidu, 2017). Presenta un gran impacto en el cultivo de vid a nivel mundial, generando enormes pérdidas (Maree et al., 2013). La incidencia de GLRaV-3 es superior a la de GLRaV-1 en países como Brasil, Sudáfrica y Estados Unidos, lo que se debe a una mejor eficiencia de sus vectores transmisores (Habibi et al., 2007).

La sintomatología característica de GLRaV-3 coincide con los síntomas típicos de GLD descritos anteriormente. Existe gran variabilidad sintomatológica dependiendo de la cepa y la variedad infectada o de la estación del año (Maree et al., 2013).

Existe evidencia de la presencia combinada de los diferentes GLRaVs coinfectando una misma planta (Maree et al., 2013) y solo se ha descrito como patógeno de *V. vinifera* (Martelli, 2014).

Presentan un genoma bipartito, con una región rica en U en el extremo 5'UTR que destaca por su gran longitud respecto al resto de virus de su misma familia. Presenta gran variabilidad genética, por lo que se han definido diferentes cepas víricas dentro de este grupo (Maree et al., 2013).

La transmisión de GLRaV-3 se ha producido en muchos casos por intercambio y propagación de material vegetal infectado así como por una gran variedad de insectos vectores (Maree et al., 2013).

### ***Vitivirus: Grapevine virus A (GVA) y Grapevine virus B (GVB)***

Tanto GVA como GVB afectan a cultivos de vid de todo el mundo (Adams et al., 2004). Ambos se han asociado con la enfermedad de madera rugosa. Los síntomas varían entre cultivares y también dependen de la época del año, siendo más visibles en épocas de calor. El síntoma principal que producen es una apariencia rugosa en el tronco, pero también provoca una gran reducción del crecimiento y el rendimiento, se produce una pérdida de vigor, los racimos son más pequeños e incluso provocan incompatibilidad de injerto. GVA produce ranuras muy marcadas en el tallo (*Kober stem grooving*), mientras que GVB destaca por producir ranuras y punteaduras en toda la superficie de tallo y en algunos casos produce un enrollamiento y enrojecimiento de las hojas, de forma similar a GLRaVs (*Corky bark*) (Martelli, 2014).

La enfermedad inducida por GVA y GVB se mantiene en estado latente en plantas de *V. vinifera* no injertadas, en la mayoría de las especies de *Vitis* americanas y los patrones híbridos desarrollados en viñas injertadas (Martelli, 2014). Así mismo, las plantas de *V. rupestris* son asintomáticas para GVA. Este virus se ha descrito también en *Actinidia sp.* (Adams et al., 2004).

Existe evidencia de coinfección de GVA y GVB junto a GLRaV-1 y -3 lo que parece indicar que la transmisión de *Vitivirus* se ve favorecida por *Ampelovirus* (Hommay, Komar, Lemaire, & Herrbach, 2008).

Los genomas de GVA y GVB están formados por una única molécula de ARN de cadena simple. Ambos virus presentan una estructura genómica y secuencia genética similares, codificando para 5 ORFs (Martelli, Adams, Kreuze, & Dolja, 2007).

Se han descrito varios vectores que transmiten estos virus de viña a viña como *Pseudococcus mealybugs*, *Planococcus citri*, *P. ficus*, *Pseudococcus longispinus*, *P. affinis*, *Heliococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris* y *Neo Pulvinaria innumerabilis* (Martelli, 2014). *Parthenolecanium corni* es un insecto vector común para las especies virales GVA y GLRaVs (Hommay et al., 2008).

**Tabla 1.** Resumen de las principales características de cada uno de los virus que son objeto del presente proyecto.

Virus	Taxonomía		Síntomas	Huéspedes	Vector
	Familia	Género			
GFLV	Secoviridae	Nepovirus	Malformaciones, mosaicos y bandeado.	<i>V. rupestris</i> , <i>V. vinifera</i> y otras ( <i>N. tabacum</i> , <i>Chenopodium sp.</i> , <i>P. vulgaris</i> , etc.)	Nemátodo: <i>X. index</i>
ArMV			Deterioro vegetal, mosaicos, retraso del crecimiento y malformaciones.	<i>Fragaria</i> , <i>Humulus</i> , <i>Vitis spp.</i> , <i>Rubusidaeus</i> , <i>Rheum spp.</i> , etc.	Nemátodo: <i>X. diversicaudatum</i>
TBRV			Bajada del rendimiento, falta de vigor y crecimiento, mosaicos cloróticos.	<i>Prunus sp.</i> , <i>Rubus sp.</i> , tomate, <i>Vitis</i> , <i>Fragaria</i> , <i>Cucurbita</i> , etc.	<i>L. elongatus</i> y <i>L. attenuatus</i>
RpRSV			Moteados cloróticos, malformaciones en hojas y enanismo.	Tomate, brásica, <b>frutos rojos</b> , narciso, <b>vid</b> , <i>Prunus</i> , etc.	Nemátodos: <i>L. macrosoma</i> , <i>L. elongatus</i> y <i>P. maximus</i>
SLRSV		No asignado	Bajada del rendimiento, malformaciones, moteado clorótico y retraso del crecimiento.	<b>Frutos rojos</b> , <b>vid</b> , melocotón, saúco, rosas, apio, etc.	<i>X. diversicaudatuma</i>
GFkV	Tymoviridae	Maculavirus	Incompatibilidad de injerto, clareado de las venas, rizado de hojas, retraso del crecimiento y raíces pobres.	<i>V. vinifera</i> , <i>V. rupestris</i>	No descrito
GLRaV-1	Closteroviridae	Ampelovirus	Enfermedad del rizado de la hoja	<i>V. vinifera</i>	Insectos: <i>Pseudococcidae</i> y <i>Coccidae</i>
GLRaV-2		Closterovirus			No descrito
GLRaV-3		Ampelovirus			Insectos
GVA	Betaflexiviridae	Vitivirus	Enfermedad de madera rugosa	<i>V. rupestris</i> ; <i>V. vinifera</i> ; <i>Actinidia sp.</i>	<i>P. mealybugs</i> , <i>Planococcus citri</i> , <i>P. ficus</i> , etc.
GVB					

## 1.2. Control de los virus fitopatogénicos en la vid y métodos de diagnóstico

La viña es un cultivo que se multiplica por propagación vegetativa e injerto. En cualquiera de los dos casos, si las plantas de partida están infectadas por uno o varios virus, estos serán transmitidos a las nuevas plantas. Además, son plantas de vida media larga (varias décadas), lo que aumenta la probabilidad de infección vírica por vectores naturales (Osman, Leutenegger, Golino, & Rowhani, 2008). La gran variabilidad y complejidad de los virus mencionados, dificulta encontrar tratamientos viricidas o controles biológicos y biotecnológicos para erradicar los virus, cuya concentración y sintomatología varían a lo largo del año (F. E. Constable, Connellan, Nicholas, & Rodoni, 2012; Crespo et al., 2015). Actualmente, las medidas de control son preventivas y se basan en la eliminación de los vectores transmisores y en la aplicación de prácticas culturales adecuadas para evitar que los virus entren en contacto con los cultivos (limpieza y desinfección



de herramientas de corte y poda o saneamiento de variedades). Una vez que una planta ha sido infectada por alguno o algunos de los virus mencionados la medida a tomar es la erradicación, lo que conlleva a su destrucción para evitar que sea transmitido al resto del cultivo. Por todo ello, es muy importante disponer de métodos eficaces y precoces de detección (Bruissson et al., 2017), que garanticen la sanidad del material vegetal base y que permitan la detección viral en estadios iniciales de la enfermedad. Cabe destacar los siguientes métodos de detección:

**Ensayo biológico.** Consiste en la inoculación de plantas sensibles a la enfermedad con extracto vegetal de las plantas que se quieren testar para comprobar si manifiestan síntomas con posterioridad (Osman, Leutenegger, Golino, & Rowhani, 2008). Su principal ventaja es que permite detectar nuevas cepas mutantes de los agentes patógenos (Rwahnih, Daubert, Golino, Islas, & Rowhani, 2015). A pesar de ser una técnica sensible (Rwahnih et al., 2015), requiere mucho tiempo para visualizar el desarrollo de la enfermedad, experiencia en lectura de síntomas, pues se precisa conocer los efectos de factores como el ambiente o la época del año en el desarrollo de los síntomas (Constable, Connellan, Nicholas, & Rodoni, 2012). Así mismo, se requiere mucho espacio de invernadero, dado que se necesitan instalaciones de seguridad sanitaria con malla de contención (Bruissson et al., 2017). Sin embargo, esta técnica es necesaria para establecer los síntomas precisos y específicos en distintas especies o variedades de cada aislado o cepa viral estudiada.

**Inmunoensayo.** Este concepto abarca al conjunto de técnicas inmunológicas analíticas en las que se usan anticuerpos para cuantificar la presencia de algún antígeno, en este caso el agente viral, usando como marcador una molécula que permita detectar la unión antígeno-anticuerpo. Los inmunoensayos se basan en la especificidad y afinidad de los anticuerpos por sus antígenos observándose un cambio de color y un aumento de los niveles de absorbancia cuando la muestra es positiva. El ensayo ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), que es uno de los más utilizados para la detección viral, permite detectar la presencia de patógenos obteniendo resultados de presencia/ausencia. Presenta la ventaja de que permite la identificación viral de forma económica, rápida y específica cuando no hay datos disponibles sobre las secuencias genómicas de los virus (Harper, Delmiglio, Ward, & Clover, 2011). Su principal desventaja es que su sensibilidad depende de la especificidad del anticuerpo empleado y generalmente es una técnica menos sensible que las técnicas moleculares. Por ello, no se suelen poder detectar patógenos virales que se acumulan en concentraciones reducidas en la planta o en estadios iniciales de la enfermedad, donde la concentración viral es menor (Crespo et al., 2015). También se pueden producir falsos negativos si los anticuerpos no reconocen todos los aislados o falsos positivos si los reactivos o anticuerpos interactúan con proteínas propias de la planta. Además, los resultados pueden variar dependiendo del lote de anticuerpos utilizados. Por otra parte, el número de falsos negativos se reduce usando ELISA indirecto o cócteles de distintos anticuerpos (Bruissson et al., 2017).

Otra variante utilizada es la Inmunoimpresión-ELISA, en la que no es necesario hacer el extracto vegetal, siendo suficiente con poner en contacto una sección del material vegetal infectado contra una membrana sobre la que posteriormente se realiza el inmunoensayo. Se trata de una técnica rápida, sencilla y sensible (Cambra et al., 1999), pero solo se ha optimizado para algunos virus virus y también es dependiente de la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** La detección vírica se hace a nivel genético. Se basa en el uso de cebadores específicos de regiones genómicas conservadas para aumentar el número de copias del material genético viral y detectar así su presencia en un determinado material vegetal. Es una técnica que requiere poco tiempo manteniendo una alta sensibilidad y especificidad con respecto a ELISA (Bertolini, García, Yuste, & Olmos, 2010). Una de sus desventajas es la aparición de falsos negativos debidos a la presencia de inhibidores de la reacción de PCR en los extractos vegetales (Bertolini et al., 2010; Osman et al., 2008).

La reacción de PCR requiere un molde de hebra doble (dsADN). Sin embargo, existen virus cuyo genoma es de hebra única (ssADN) o de ARN de hebra doble o sencilla (dsRNA, ssARN) (Baltimore, 1971). Dado que los virus analizados en el presente proyecto son de ssARN, se requiere una fase previa de retrotranscripción a ADN, catalizada por una retrotranscriptasa, que duplica la hebra molde simple dando lugar a un ADN complementario (cADN) a la cadena de ssARN viral. Este tipo de PCR recibe el nombre de PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR).

Las primeras técnicas de PCR o RT-PCR desarrolladas van asociadas a métodos de detección post-reacción, como la electroforesis en gel de agarosa o hibridación en membrana (menos frecuente), lo que supone pérdidas de eficiencia y especificidad, pues aumenta el riesgo de contaminación y falsos positivos (Bertolini et al., 2010; Osman et al., 2008). Más tarde, se desarrolló la PCR en tiempo real (Real Time-PCR o qPCR) que utiliza sondas marcadas con fluoróforos que permiten seguir la reacción a medida que va avanzando (ciclo de cuantificación o  $C_i$ ) y que generan una señal directamente proporcional a cantidad de material amplificado (fluorescencia de la sonda reportera o dRn) (Mumford, 2010; Osman et al., 2008). Así, se elimina el método final de detección de la PCR convencional y se reduce la posibilidad de contaminación cruzada. La RT-qPCR es un método de diagnóstico molecular rápido, cuantitativo, reproducible, muy sensible, sencillo y aplicable a un gran número de muestras (Osman, Leutenegger, Golino, & Rowhani, 2007).

Por otro lado, el número de parejas de cebadores que se utilizan en una misma reacción de PCR permite clasificar la técnica en PCR-singleplex, si se usa una única pareja, o PCR-multiplex, si hay varias parejas de cebadores por reacción. La PCR multiplex permite la detección de material genético de varios patógenos en una única reacción de PCR. Para ello se usan cebadores específicos de cada uno de los patógenos que se quieren analizar. Esta técnica permite detectar varios virus en una única reacción, con la misma eficacia que si se analizan de forma individual, lo que supone ahorro de tiempo, coste y reactivos (Osman et al., 2013). Además se pueden añadir cebadores que permitan amplificar algún gen endógeno del huésped como control interno, lo que mejora los resultados del diagnóstico (Osman et al., 2008). Esta técnica tiene como limitación una posible competitividad entre las diferentes reacciones que tiene lugar de forma simultánea que llevar al consumo de los reactivos (Osman, Hodzic, Omanska-Klusek, Olineka, & Rowhani, 2013).

La PCR multiplex se puede realizar por PCR-convencional, con distintos tamaños entre los productos de PCR o por q-PCR usando sondas marcadas con fluoróforos que presenten espectros de emisión no solapantes. En la RT-PCR multiplex convencional es necesario un gel de agarosa o cualquier otra técnica equivalente para visualizar los resultados, lo que requiere tiempo y supone una limitación en cuanto al número de muestras (Osman, Hodzic, Omanska-Klusek, et al., 2013). Sin embargo, la RT-qPCR supone un aumento de la precisión y reproducibilidad en el diagnóstico (López-Fabuel et al., 2013).

Si se tienen en cuenta las ventajas e inconvenientes de cada una de las tecnologías descritas anteriormente, se puede afirmar que el ensayo biológico no es una técnica adecuada para la detección específica del causante de una enfermedad o para comprobar si el material está o no libre de organismos fitopatógenos. Es menos sensible y específica, y requiere más tiempo que otras técnicas como PCR o ELISA. Además, no se pueden analizar mezclas complejas de especies o variantes virales (Rwahnih et al., 2015). Por lo tanto el análisis biológico sería poco factible para el planteamiento realizado en el presente proyecto.

En cuanto a ELISA y RT-PCR existen multitud de estudios en los que se comparan ambas tecnologías para la detección viral. Dependiendo de la zona geográfica, de la época del año en la que se analizan los virus, los kits de ELISA y los reactivos de RT-PCR que se emplean, los tejidos vegetales de partida o los cultivares, incluso según los virus analizados, se tiene eficacia de diagnóstico elevada o reducida de cada una de ellas. Cabe señalar que pocas veces se alcanza

eficacia de diagnóstico del 100% (Constable et al., 2012) y ambas se ven limitadas por la posibilidad de generar falsos positivos y negativos (López-Fabuel et al., 2013). Sin embargo, la reacción de RT-PCR, requiere menos tiempo de ejecución manteniendo una alta sensibilidad y especificidad en comparación con el ELISA (Bertolini et al., 2010).

Dentro de las variantes de PCR, la RT-PCR convencional va asociada a métodos de detección que suponen un riesgo de contaminación. Sin embargo, en la PCR en tiempo real es un método rápido, cuantitativo, reproducible, muy sensible, sencillo y aplicable a un gran número de muestras (Osman et al., 2007). Hay estudios que muestran una mayor eficacia frente a ELISA (Bertolini et al., 2010; Olmos et al., 2016) y PCR convencional (Osman et al., 2007). Por otro lado, la PCR multiplex permite detectar y caracterizar varios virus de forma simultánea reduciendo el número de análisis y los costes que de ellos se derivan. Además, se puede añadir la detección simultánea de algún gen endógeno del huésped como control interno para comprobar el correcto desarrollo de la técnica (Mumford, 2010; Osman, Hodzic, Omanska-Klusek, et al., 2013; Osman & Rowhani, 2008). El multiplexado puede hacerse por PCR convencional o bien por real time RT-PCR convencional. La RT-qPCR multiplex aumenta la precisión y reproducibilidad en el diagnóstico con respecto a la convencional y se ha visto que es más sensible y reproducible que el ELISA (López-Fabuel et al., 2013) y que permite la detección de forma tan robusta como RT-qPCR singleplex (Osman, Hodzic, Omanska-Klusek, et al., 2013).

Las ventajas de la RT-qPCR multiplex frente al resto de las técnicas de diagnóstico mencionadas, hacen que fuese la tecnología elegida para desarrollar una técnica de diagnóstico para la detección de los principales virus patógenos de vid.

Para el desarrollo de este proyecto, en el que se pretende elaborar una tecnología para la detección de los principales virus afines a vid, anteriormente mencionados, se decidió utilizar la PCR por su elevada eficacia y sensibilidad respecto a las otras estrategias planteadas. Dado que los virus presentan un genoma de ssARN se recurrió a RT-PCR, en concreto a RT-PCR multiplex, con la finalidad de reducir el número de análisis necesario para certificar si una determinada planta de viña cumple los requisitos de sanidad vegetal exigidos por la legislación. Existen trabajos previos en los que se desarrollan técnicas similares a la desarrollada en este Trabajo de Fin de Grado. En las más actuales, se plantean tecnologías de análisis de algunos virus en viña mediante RT-qPCR singleplex (Bertolini et al., 2010; Olmos et al., 2016; Osman et al., 2007; Osman & Rowhani, 2008), y en otras por RT-qPCR multiplex (López-Fabuel et al., 2013; Osman, Hodzic, Omanska-Klusek, et al., 2013). Sin embargo, en ninguno de ellos se desarrolla una tecnología de análisis por RT-qPCR que abarque a todos los virus recogidos en la legislación y multiplexados en su mayoría.

## 2. OBJETIVOS

El presente proyecto tiene como finalidad el desarrollo de una técnica de diagnóstico para los principales patógenos virales que afectan a los cultivos de vid en España y el resto de la Unión Europea. Para abordar este objetivo general se han fijado los siguientes objetivos específicos:

Desarrollo de métodos de diagnóstico basados en la detección de ARN específico para cada uno de los virus GFLV, ArMV, TBRV, RpRSV, SLRSV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA y GVB.

1. GVA y GVB, mediante RT-PCR convencional.
2. Diseño de un sistema de detección conjunta de los virus mediante RT-PCR convencional multiplex.
3. Optimización de la PCR multiplex para su uso en una plataforma diagnóstica de PCR a tiempo real.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

##### 3.1.1. Material vegetal infectado con cepas tipo

En primer lugar, para poner a punto los sistemas de diagnóstico de los diferentes virus, se emplearon controles positivos obtenidos de diferentes casas comerciales (Tabla 2). La casa comercial proporciona tejido vegetal liofilizado, procedente de plantas infectadas con cepas tipo de colección perfectamente caracterizadas. El fabricante que proporciona los controles de calidad advierte de una posible coinfección por varios virus.

*Tabla 2. Cepas tipo de colección utilizadas como controles positivos de PCR.*

Virus	Controles positivos	
	Casa comercial	Referencia
<b>GLRaV-1</b>	Bioreba	120953
<b>GLRaV-2</b>	Neogen	1150
<b>GLRaV-3</b>	Bioreba	120953
<b>GFLV</b>	Bioreba	120453
<b>ArMV</b>	Loewe	07053PC
<b>SLRSV</b>	Loewe	07115PC
<b>TBRV</b>	Loewe	07062PC
<b>RpRSV</b>	Loewe	07141PC
<b>GVA</b>	Bioreba	122253
<b>GVB</b>	-	-
<b>GfKv</b>	SEDIAG	Fk-LPC

##### 3.1.2. Material vegetal de campo

En el presente proyecto se analizan un total de 44 plantas de campo procedentes de varias zonas de Murcia y Valencia, para testar cada una de las técnicas puestas a punto en este trabajo. De entre las plantas analizadas 10 estaban incluidas a su vez en un proyecto de saneamiento *in vitro* a fin de poder ser utilizadas como planta madre para multiplicación. Tras la recepción las plantas se examinaron visualmente para comprobar si existía correlación entre la sintomatología típica de los virus que ocupan el presente proyecto y los resultados obtenidos.

#### 3.2. Extracción de ácidos nucleicos

Dado que la distribución de los virus es heterogénea entre los tejidos de la planta, es necesario hacer un muestreo representativo de cada planta. Para ello se tomaron pequeños fragmentos de diferentes tejidos y regiones para aumentar así la posibilidad de obtener material infectado en caso de que el virus esté presente. Tal y como Weber et al. recomiendan, para el análisis de *Nepovirus* (ArMV, GFLV, RpRSV, TBRV, SLRSV y GfKv) se partió de hojas de brotes jóvenes, corteza verde y floema de tallos maduros y la extracción se realizó durante el periodo de desarrollo (Weber et al. 2002). Para *Closterovirus* y *Ampelovirus* (GLRaV-1, -2 y -3) se seleccionaron hojas maduras, peciolas y venas de la parte baja de la planta. Durante el periodo de reposo vegetativo lo mejor es partir de varetas sin hojas (BIOREBA, 2018). Por último, para GfKv se aconseja partir de brotes y hoja joven en primavera, pudiendo ser detectado también en floema de tallos maduros en otoño o invierno (Crespo et al., 2015).

Una vez seleccionado el material vegetal, se trituró en frío para minimizar la degradación viral. La extracción se realizó en bolsas de malla gruesa por disrupción del tejido vegetal mediante acción mecánica en presencia de un tampón de extracción Phosphate-Buffered Saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

En el caso de los controles positivos, dado que se parte de material liofilizado, es suficiente con resuspender el extracto vegetal infectado en PBS y homogeneizar.

Para la purificación de los ácidos nucleicos se utilizaron dos kits comerciales, dependiendo del número de muestras y la calidad deseada del producto final. Para la extracción de ARN de los controles positivos se utilizó el kit Nucleospin ARN plant de Macherey-Nagel (MN), basado en la purificación por columna de sílice, ya que de esta forma se obtuvo ARN con elevado rendimiento y de gran calidad. Para el análisis de muestras de campo, dado el elevado número de muestras, las extracciones se automatizaron utilizando el robot Maxwell RSC y el kit Maxwell RSC Plant ARN (MW), de Promega. En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

La calidad de los ácidos nucleicos extraídos se comprobó por espectrofotometría (Nanodrop 20006). Una vez finalizada la extracción el material genético fue almacenado a -20°C para garantizar su integridad.

### 3.3. Diseño de cebadores y sondas

Inicialmente se realizó una búsqueda bibliográfica de los cebadores y sondas publicados en trabajos previos para cada uno de los virus en estudio. Las zonas del genoma idóneas para el diseño de cebadores y sondas son las regiones conservadas específicas de cada virus que son objeto del presente proyecto. Para asegurar la detección del mayor número posible de cepas del mismo virus se comprobó que las secuencias publicadas estuviesen en dichas regiones. La selección de cebadores y sondas potencialmente candidatos se realizó atendiendo a los siguientes criterios: (a) la temperatura de hibridación debía estar comprendida entre 57-60°C en caso de los cebadores y unos 10°C superior en el caso de las sondas; (b) el porcentaje de citosinas y guaninas debía estar entorno al 40-60%; (c) no debían formar homodímeros ni heterodímeros, especialmente en el extremo 3'. Para el análisis de cebadores y sondas se usaron las herramientas bioinformáticas Integrated ADN Technologies (IDT, <https://www.idtADN.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) y Multiple Primer Analyzer de thermofisher (<https://www.thermofisher.com/es/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>), disponibles online.

Se reutilizaron, con ligeras modificaciones, los cebadores y sondas diseñados previamente por otros autores para todos los virus (Harper et al., 2011; López-Fabuel et al., 2013; Mumford, 2010; Osman et al., 2007; Osman & Rowhani, 2006) excepto para GLRaV-2 y GFkV, que se diseñaron completamente de *novo* utilizando los programas Integrated ADN Technologies y Multiple Primer Analyzer de thermofisher, teniendo en cuenta que cumplieren las características anteriormente mencionadas.

Igualmente, la forma de agrupar los virus para multiplexarlos se basó en la formación de heterodímeros entre los cebadores y sondas encontrados en la bibliografía y/o diseñados para cada uno de los virus y en el tamaño del producto de PCR.

Para comprobar la especificidad de los cebadores y sondas se seleccionaron y descargaron varios genomas de cada virus del GeneBank utilizando la herramienta bioinformática BLASTn. Se realizó un alineamiento múltiple utilizando las herramientas Mega y CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). En aquellos casos en los que la secuencia presentaba variantes nucleotídicas se degeneró alguna de las bases, tanto de los cebadores y sondas publicados como de los diseñados completamente de *novo*.

### 3.4. RT-PCR convencional

Las parejas de cebadores diseñados fueron testados individualmente por RT-PCR para comprobar que amplificaban correctamente. La reacción de retrotranscripción y amplificación se realizó en un único paso utilizando el Kit enzimático AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (#AM1005), (Applied Biosystems), en el que se unifican las fases de retrotranscripción y amplificación, lo que requiere menos tiempo, el riesgo de contaminación por manipulación se reduce y se minimiza el error humano, manteniendo una eficiencia similar a RT-PCR en dos pasos (Osman, Olineka, Hodzic, Golino, & Rowhani, 2012).

La reacción de RT-PCR se preparó adicionando al cóctel de reacción 2X RT-PCR Buffer; 25X RT-PCR Enzyme Mix; 2 µL de ARN molde y agua libre de nucleasas para un volumen de reacción de 12 µL. Se testaron dos concentraciones finales de cebadores, 400 y 100 nM. El programa de RT-PCR utilizado consta de una fase inicial de retrotranscripción de 10 min a 45°C, seguida de una fase de desnaturalización de 10 min a 95°C y 40 ciclos de amplificación de 30 s a 95°C, 40 s a 59°C y 40 s a 72°C, finalizando el programa con una fase elongación de 7 min a 72°C.

En las reacciones se utilizaron controles positivos comerciales de cada virus y controles negativos. Seguidamente se validó la técnica por comparación con cebadores publicados en estudios previos (Bertolini et al., 2010; Harper et al., 2011; López-Fabuel et al., 2013; Mumford, 2010; Osman, Hodzic, Omanska-Klusek, et al., 2013; Osman & Rowhani, 2006).

Una vez comprobada la eficacia de los cebadores de forma individual, se pasó al ensayo por RT-PCR multiplex. El cóctel de reacción optimizado para cada grupo fue: 2X RT-PCR Buffer; 400 nM de cada cebador directo y reverso; 25X RT-PCR Enzyme Mix; 2 µL de ARN molde; albumina de suero bobino (BSA 0.1%) y agua libre de ARNs para un volumen de reacción de 20 µL. El programa de reacción óptimo resultó ser diferente para cada grupo, y puede consultarse en la Tabla 7 (en el apartado 4.4.3 de resultados y discusión).

La reacción de amplificación se comprobó mediante electroforesis durante 35 min a 100 V en gel de agarosa a una concentración de 2.5% en tampón TAE 10X (48.4 gr de Tris, Na<sub>2</sub>EDTA 0.5M (pH 8.0) y 11.42 ml de ácido acético glacial por litro) y teñido con RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology). Los geles se visualizaron en un equipo de fotodocumentación Vilber-Lourmat E-box VX5.

### 3.5. RT-PCR a tiempo real (RT-qPCR)

El paso a RT-qPCR implicó asignar a cada virus, una sonda TaqMan, que porte en el extremo 5' un fluoróforo. Las sondas Taqman se diseñaron siguiendo los criterios mencionados en la guía de Applied Biosystem para la optimización de PCR multiplex utilizando sondas TaqMan. Cada sonda tiene en su secuencia un sistema de bloqueo de fluorescencia formado por uno o dos *quenchers* no fluorescentes, que aumentan la precisión en la cuantificación al disminuir la señal de fondo (Applied Biosystems). Se utilizaron *quenchers* ZEN™ o TAO™, altamente eficaces en reducir el ruido de fondo y en todos los casos en los que fue posible, se utilizó un sistema doble de bloqueo, que mejora la precisión y sensibilidad respecto a las sondas convencionales además de reducir las interferencias entre sondas en reacciones multiplex (IDT, <https://eu.idtADN.com/pages/education/decoded/article/increase-sensitivity-and-precision-in-your-qpcr-experiments>). En la Tabla 3 aparece la información relativa a cada sonda utilizada para cada uno de los virus.

Del mismo modo que para la RT-PCR, se usaron los reactivos del Kit enzimático AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (#AM1005) y la plataforma de diagnóstico QuantStudio 5 Real-Time PCR Instrument (Applied biosystems), para la reacción en cadena de la polimerasa.

**Tabla 3.** Información sobre las sondas asociadas a cada virus: fluoróforo, longitud de onda de emisión ( $\lambda$ ) en nanómetros, el sistema de bloqueo y el grupo multiplex, diferenciado por colores.

Virus	Grupo	Sonda	Fluoróforo	$\lambda$ emisión (nm)	Quenchers	
GFkV	1	S-GFkV	Cy5	668	Int TAO™	3' Iowa Black® RQ-Sp
GFLV		S-GFLV	Texas Red®-X	617	-	Iowa Black® RQ-Sp
GLRaV3		S-GLRaV3	FAM	520	Int ZEN™	3' Iowa Black® FQ
GVB		S-GVB	Texas Red®-X	617	-	Iowa Black® RQ-Sp
GLRaV1	2	S-GLRaV1	FAM	520	Int ZEN™	3' Iowa Black® FQ
GLRaV2		S-GLRaV2	Cy5	668	Int TAO™	3' Iowa Black® RQ-Sp
SLRSV		S-SLRSV	HEX	555	Int ZEN™	3' Iowa Black® FQ
ArMV	3	S-ArMV	FAM	520	Int ZEN™	3' Iowa Black® FQ
RpRSV		S-RpRSV	Cy5	668	Int TAO™	3' Iowa Black® RQ-Sp
TBRV		S-TBRV	Texas Red®-X	617	-	Iowa Black® RQ-Sp
COX		S-COX	HEX	555	Int ZEN™	3' Iowa Black® FQ
GVA	Individual	S-GVA	FAM	520	Int ZEN™	3' Iowa Black® FQ

Los cebadores de los virus ArMV, RpRSV, TBRV, GFkV, GLRaV-2 y los del gen COX fueron evaluados en primer lugar usando el fluoróforo SYBR-Green. Cada reacción contenía 2X RT-PCR Buffer, 0.5  $\mu$ L de SYBR-Green ResoLight (Roche), 25X RT-PCR Enzyme Mix, 400 nM de cada cebador, 2  $\mu$ L de ARN molde y agua libre de ARN hasta completar un volumen final de 12  $\mu$ L. El programa que se utilizó consta de una etapa inicial de retrotranscripción de 10 min a 45°C, seguida de una fase de desnaturalización de 10 min a 95°C y 40 ciclos de amplificación de 30 s a 95°C, 30 s a 59°C y 40 s a 72 °C. La reacción se comprobó generando las curvas de melting o disociación.

En segundo lugar, se comprobó la eficacia de cada reacción de RT-qPCR de forma individual, para evaluar cada una de las sondas. El contenido de cada cóctel reacción RT-qPCR singleplex era el mismo que el mencionado para las pruebas anteriores, pero sustituyendo SYBR-Green ResoLight por 0.2  $\mu$ M de cada sonda en cuestión. El programa utilizado para cada virus de forma individual aparece en la Tabla 6 (en el apartado 4.4.3. de resultados).

Por último, cada agrupación de virus multiplexada, se probó conjuntamente en un mismo cóctel de reacción. Dentro del mismo grupo, el fluoróforo que porta cada sonda TaqMan tiene distinta longitud de onda de emisión, de forma que se evitan solapamientos entre sus espectros y permite detectar cada reacción que tiene lugar en individualmente. El cóctel de reacción optimizado contiene en todos los casos 2X RT-PCR Buffer, 1  $\mu$ L de 25X RT-PCR Enzyme Mix y 1.5  $\mu$ L de ARN. Para cada grupo de virus multiplexado se optimizaron las concentraciones de cebadores y sonda (Tabla 6, en el apartado 4.4.3. de resultados y discusión). El programa de PCR utilizado para cada grupo aparece en la Tabla 7 (en el apartado 4.4.3. de resultados).

Al igual que con la RT-PCR convencional, en las reacciones de RT-qPCR se usaron controles positivos comerciales para la puesta a punto inicial.

Para evaluar los parámetros de sensibilidad, repetitividad y reproducibilidad, las concentraciones de ARN de los controles positivos se ajustaron a una concentración similar para cada grupo teniendo en cuenta el  $C_t$  al que se detectaba cada uno de los virus. Para determinar sensibilidad, en primer lugar se calculó el rango dinámico lineal, representando el valor de  $C_t$  frente logaritmo de la concentración de la fase exponencial de curvas generadas para diluciones seriadas utilizando un factor de dilución de 10. Seguidamente se determinó la eficiencia de la amplificación aplicando la fórmula  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$  (Bustin et al., 2009). Cada RT-qPCR multiplex se repitió al menos tres veces para comprobar la repetitividad, comparando los valores de  $C_t$  generados en cada caso, para comprobar si eran muy diferentes entre las distintas reacciones. Finalmente, la tecnología se



validó comparando los resultados obtenidos al analizar diferentes plantas de campo con la tecnología desarrollada y con otras técnicas de diagnóstico que se usan en ValGenetics SL.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Material vegetal y extracción de ácidos nucleicos

La preparación de la muestra es uno de los principales factores que influyen en la eficacia del método de detección. Diferentes tipos de muestras y tejidos contienen diferentes concentraciones de factores inhibidores de la RT-PCR, como compuestos fenólicos o polisacáridos (MacKenzie, McLean, Mukerji, & Green, 1997; Rowhani, Maningas, Lile, Daubert, & Golino, 1995), que deben ser eliminados. Además, el perfil de ARN mensajero (mARN) se ve altamente influenciado por el estrés que supone para las células vegetales el proceso de extracción. Por tanto, la calidad de la extracción condiciona la posterior detección viral (Osman et al., 2012). Para controlar esta variable, Bookout et al., 2006 recomiendan preparar y extraer todas las muestras que se vayan a comparar en las mismas condiciones, en el mismo periodo de tiempo y estación (Bookout, Cummins, Mangelsdorf, Pesola, & Kramer, 2006). Es por eso que en este experimento todos los controles positivos se extrajeron usando el mismo Kit de columna de sílice Nucleospin ARN plant de Macherey-Nagel (MN), pues se quería evitar la presencia de posibles inhibidores que pudiesen generar falsos negativos para la puesta a punto y se ha visto en los ensayos realizados en la propia empresa que la extracción por columna suele ser más eficaz en ese sentido. Todas las muestras de material de campo se extrajeron usando el Kit de extracción automática Maxwell RSC Plant ARN kit de Promega (MW) porque es más sencillo, se reduce el error humano y permite realizar la extracción de un gran número de muestras simultáneamente, algo inviable con el Kit de columna (Osman et al., 2012). Cuando se utiliza el kit Maxwell la muestra no pasa por columna lo que aumenta probabilidad de arrastrar compuestos inhibidores, lo que se solucionó adicionando al cóctel de reacción BSA, que reduce los efectos inhibitorios.

Una vez extraídos los ácidos nucleicos se cuantificaron midiendo la absorbancia de 1-2  $\mu$ l de cada una de las muestras a 260 nm usando el Nanodrop. El perfil de absorbancia de la muestra y los ratios 260/280 y 260/230, que deben tener un valor en torno a dos, permiten valorar la calidad del material genético extraído. Hay que tener en cuenta que la mayor parte será mARN vegetal y que la proporción ARN viral no es siempre la misma, debido a los diferentes niveles de infección que pueden presentar las plantas. La cantidad y calidad de las extracciones fue variable, las realizadas con el kit de columna no resultaron adecuadas para las cepas tipo de GFkV, ArMV y RpRSV, porque su concentración era menor, de modo que se repitió la extracción, utilizando el kit de extracción automática, que permitió una mejor recuperación de ácidos nucleicos.

### 4.2. Diseño de cebadores y sondas

Inicialmente se realizó una búsqueda bibliográfica de aquellas secuencias publicadas y testadas en estudios previos y se seleccionaron los cebadores y sondas publicados para los virus GLRaV-1 y -3, GFLV, ArMV, RpRSV, TBRV, COX y los cebadores para la detección de SLRSV y GVA. Los estudios de los que se seleccionaron estas secuencias aparecen en la Tabla 4.

Se comprobó en qué región del genoma se situaban las secuencias publicadas ya que los virus de ARN muestran un ratio de mutación elevado por la baja eficacia de la prueba de lectura y la escasa capacidad de reparación post-replicativa, lo que puede generar problemas para su detección por PCR (Osman et al., 2007; Pacifico, Caciagli, Palmano, Mannini, & Marzachi, 2011). Es por ello que se realizó un estudio bioinformático de los genomas de cada uno de los virus caracterizados en estudios previos para recurrir a regiones altamente conservadas del genoma. El número de accesiones disponibles en GenBank que se utilizaron para realizar los alineamientos varió de 6 a 38 dependiendo del patógeno (Tabla 4), pues se descargaron aquellas de menor score ( $<10E-5$ ) con mayor cobertura e identidad. Los cebadores de GVB, GVA, SLRSV, RpRSV y ArMV se sitúan en regiones codificantes para proteínas de la cápsida, los de TBRV se sitúan en la poliproteína 2 (P2), en concreto en la región codificante para proteínas de la cápsida también

(Harper et al., 2011; Le Gall, Lanneau, Candresse, & Dunez, 1995), los de GLRaV-1 y -3 se localizan en las regiones codificantes para proteínas de choque térmico, altamente conservadas en los *Closterovirus* y los de COX, en la región codificante para el enzima ciclooxygenasa, tal y como se indica en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Características de los cebadores utilizados para la detección de cada uno de los virus recogidos en el presente proyecto y del control interno COX.

Virus	Grupo	Cebadores/Sondas	Modificaciones	Tamaño (pb)	Localización	Nº secuencias	Referencia
GLRaV-3	1	F-GLRaV3	-	190	HSP70h	11	Osman and Rowhani (2006)
		R-GLRaV3	Longitud				
		S-GLRaV3	-				
GFLV		F-GFLV	Longitud	100	ARN 2	10	Osman and Rowhani (2006)
		R-GFLV	Longitud y degeneraciones				
		S-GFLV	Degeneraciones				
GFKV		F-GFKV	Degeneraciones	125	Replicasa	12	Diseño propio
		R-GFKV	Degeneraciones				
		S-GFKV	Degeneraciones				
GVB	F-GVF	Degeneraciones	260	Proteína de cápsida	10	Diseño propio	
	R-GVB	-					
	S-GVB	Degeneraciones					
GLRaV-1	2	F-GLRaV1	-	110	HSP 70	14	Osman et al. (2007)
		R-GLRaV1	Longitud				
		S-GLRaV1	Longitud				
GLRaV-2		F-GLRaV2	Degeneraciones	300		11	Diseño propio
		R-GLRaV2	Degeneraciones				
		S-GLRaV2	Degeneraciones				
SLRSV		F-SLRSV	Nuevo	150	Proteína de cápsida	6	Bertolini et al. 2001
		R-SLRSV	Longitud				
		S-SLRSV	Degeneraciones				Diseño propio
ArMV	3	F-ArMV	-	84	Proteína de cápsida	45	López-Fabuel 2013
		R-ArMV	-				
		S-ArMV	Longitud				
TBRV		F-TBRV	Degeneraciones	73	P2 ORF	23	Harper et al 2011
		R-TBRV	Degeneraciones				
		S-TBRV	Cambia una base				
RpRSV		F-RpRSV	-	82	Proteína de cápsida	13	Mumford et al. 2009
		R-RpRSV	Ya estaba degenerado				
		S-RpRSV	-				
COX	F-COX	-	79	Gen COX	11	Mumford et al. 2009	
	R-COX	Ya estaba degenerado					
	S-COX	-					
GVA	-	F-GVA	Longitud y degeneraciones	300	Proteína de cápsida	12	Empresa
		R-GVA	-				
		S-GVA	Degeneraciones				Diseño propio

La mayoría de las secuencias que se seleccionaron de las propuestas por otros autores se modificaron (Tabla 4) para adaptar la temperatura de alineamiento a 59-60°C que debe ser lo más homogénea posible entre los cebadores y sondas de un mismo grupo multiplex. Además hubo que degenerar algunos nucleótidos situados en posiciones variables para conseguir que todas las cepas incluidas en el estudio bioinformático fuesen detectables por la tecnología en desarrollo. En ningún caso el número de bases degeneradas en una misma secuencia fue superior a 3 para evitar una bajada excesiva de la especificidad.

En una primera aproximación, para los virus GLRaV-2 y GFkV se trataron de reutilizar los cebadores y sondas diseñados por Osman et al., 2007 y Osman et al., 2008, respectivamente, pero tal y como se explica en el apartado de validación en muestras de campo (4.7.), se rediseñaron de *novo*, en otras regiones del genoma viral. También se diseñaron de nuevo el cebador reverso y la sonda de SLRSV, porque su temperatura de alineamiento y su longitud eran muy elevadas respectivamente. Así como la sonda de GVA y los cebadores y sondas de GBV, al no encontrar secuencias propuestas por otros autores que cumplieren los requisitos de temperatura de alineamiento, porcentaje de GC y región del genoma deseados.

Los grupos multiplex debían estar formados por cuatro virus ya que es el máximo número de canales de lectura diferentes que el termociclador de qPCR disponible (QuantStudio 5 Real-Time PCR Instrument) permite leer por reacción. Los grupos diseñados son: uno de cuatro virus y dos grupos de tres virus cada uno, incluyendo en el tercer grupo los cebadores y sondas del control interno COX (Tabla 4). Como se observa en la Tabla 4, los tamaños de los productos de PCR de cada uno de virus que forman parte de un mismo grupo son diferentes, requisito imprescindible para poder multiplexarlos por PCR convencional.

GVA no pudo multiplexarse por problemas de incompatibilidad entre sus cebadores directo y reverso y el resto de cebadores y sondas. Una futura aproximación podría ser tratar de diseñar cebadores directo y reverso de *novo* de modo que se puedan incluir en alguno de los grupos 1 y 2.

De esta forma, se realizó un diseño teórico de una tecnología de RT-PCR, que pretendía ser una herramienta más potente que las diseñadas hasta la fecha pues permite detectar cualquier aislado viral ya registrado y caracterizado en bibliografía, además de garantizar el multiplexado teórico de todos los virus propuestos.

### **4.3. RT-PCR convencional**

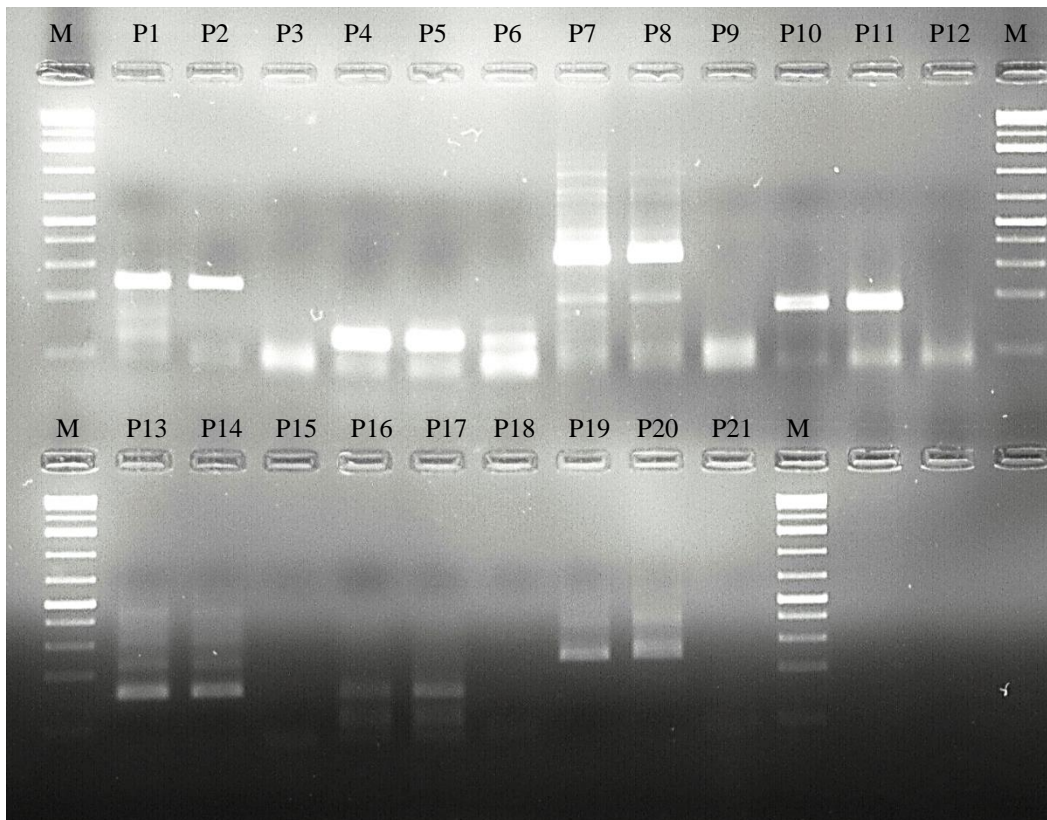
#### ***4.3.1. Prueba experimental de los cebadores***

En primer lugar, se comprobó que los cebadores seleccionados y/o diseñados para la detección de cada uno de los virus funcionaban correctamente. Para ello se utilizaron cepas tipo de colección, que se obtuvieron de diferentes casas comerciales indicadas en la Tabla 2 (ver materiales y métodos). No se encontró ningún control positivo de GVB en ninguna de las casas comerciales consultadas, lo que puede ser debido a la baja incidencia de este virus en el territorio europeo. Esto impidió probar los cebadores y sondas diseñados para la detección de ese virus, así como su inclusión en la tecnología desarrollada. La RT-PCR convencional se realizó para todos los virus excepto para los del grupo 3 (ArMV, TBRV y RpRSV), que tienen un tamaño de producto de PCR tan pequeño que no se puede visualizar correctamente en un gel de agarosa (Tabla 4).

En cuanto al programa de PCR utilizado, se realizaron varias pruebas cambiando la duración (40 s y 45 s) y la temperatura (59 y 60°C) de la fase de alineamiento, así como la duración de la fase de elongación (40 s y 1 min). El programa que mejor funcionó para la mayoría de parejas de cebadores consistía en fase inicial de retrotranscripción de 10 min a 45°C, seguida de una fase de

desnaturalización de 10 min a 95°C y 40 ciclos de amplificación de 30 s a 95°C, 40 s a 59°C y 40 s a 72°C, finalizando con una fase elongación de 7 min a 72°C. Sin embargo, para los cebadores directo y reverso de GfKV hubo que aumentar los tiempos de alineamiento a 45s y de elongación a 1 min y para los de GLRaV-1 subir la temperatura de alineamiento 1°C.

También se hicieron pruebas a dos concentraciones de cebadores, 100 y 400 nM, para comprobar si afectaba a los resultados, que fueron similares para cada pareja de cebadores, excepto para los cebadores GVA, que a una concentración 400 nM generaban bandeo inespecífico que desaparecía a 100nM. En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos para cada pareja de cebadores en sus mejores condiciones. Se observa que individualmente cada pareja de cebadores funciona correctamente, generando un amplificado claramente distinguible y del tamaño esperado.



**Figura 1.** Resultados de RT-PCR convencional para cada pareja de cebadores, con tres reacciones por pareja: dos controles positivos y uno negativo. Los pocillos P1, P2 y P2 corresponden con las reacciones de GLRaV-3 (190pb), P4, P5 y P6 con las de GFLV (100pb), P7, P8 y P9 con GLRaV-2 (300bp), P10, P11 y P12 con SLRSV (150pb), P13, P14 y P14 con GfKV (125pb), P16, P17 y P18 con GLRaV-1 (110pb), P18, P20 y P21 de GVA (300pb). M se corresponde con el marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific).

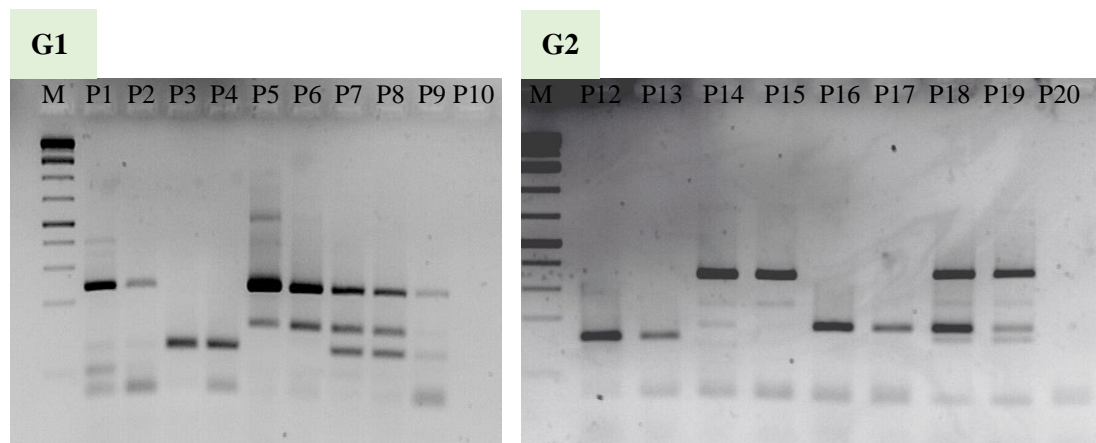
#### 4.3.2. RT-PCR convencional multiplex

El segundo subobjetivo del presente proyecto era diseñar un sistema de detección conjunta de los virus por RT-PCR convencional multiplex. Para optimizar el proceso, dado que se requiere añadir al cóctel de reacción múltiples parejas de cebadores, fue necesario reajustar el volumen final de reacción, que aumentó a 25 µl. Las concentraciones de las parejas de cebadores se mantuvieron a 400 nM. Sin embargo, se realizaron varias pruebas para ajustar el programa de reacción. Se testaron los cebadores en conjunto a una temperatura de alineamiento de 59 y 60°C, con duraciones de 30, 40 y 45 s. La fase de elongación se testó a 40 s y 1 min. Los mejores resultados para el grupo 1 se obtuvieron al usar una fase de alineamiento de 60°C durante 45 s, y una fase de elongación a 1 min. Sin embargo, para el grupo dos fue necesario bajar el tiempo de

alineamiento a 30s. El grupo 3 no pudo multiplexarse por RT-PCR convencional debido al problema de los tamaños solapantes de los productos de PCR de los cebadores utilizados. Los programas para que las tres parejas de cebadores funcionasen correctamente de forma simultánea, optimizados para cada grupo aparecen en la Tabla 7.

Las pruebas realizadas consistían testar cada uno de los controles positivos de cada virus de forma independiente y en conjunto en cada reacción, analizando cada uno de los controles por duplicado y, realizando tres veces cada una de las analíticas. En todos los casos los resultados fueron similares.

En la Figura 2 se muestran los resultados de la puesta a punto con controles positivos. Las bandas son del tamaño esperado para cada uno de los virus (Tabla 4). En los pocillos P5 y P6 aparecen dos bandas, la GFkV (~125 pb) y la de GLRaV-3 (~200pb), debido a una coinfección en el control positivo de GFkV. Para ambos grupos se observan 3 bandas en las reacciones en las que se testaron todos los controles en conjunto, por lo que se puede afirmar que en ambos casos, la RT-PCR multiplex convencional funciona correctamente. Sin embargo, en el grupo 2 la banda correspondiente a la detección de GLRaV-1 es más tenue que las otras.



**Figura 2.** Resultados del multiplexado por RT-PCR convencional de los grupos 1 y 2. El gel de la izquierda se corresponde al grupo 1 y el de la derecha al 2. Los pocillos P1-P6 y P12-P17 son los resultados de las reacciones individuales para los virus GLRaV-3 (190pb), GFLV (100pb), GFkV (125pb), GLRaV-1 (110pb), GLRaV-2 (300pb) y SLRSV (150pb), de modo que hay una muestra concentrada y otra diluida por reacción. Los pocillos P7, P8, P18 y P19 se corresponden con la amplificación simultánea de controles de los virus que forman cada grupo. Los pocillos P10 y P20 son controles negativos. M hace referencia al marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific).

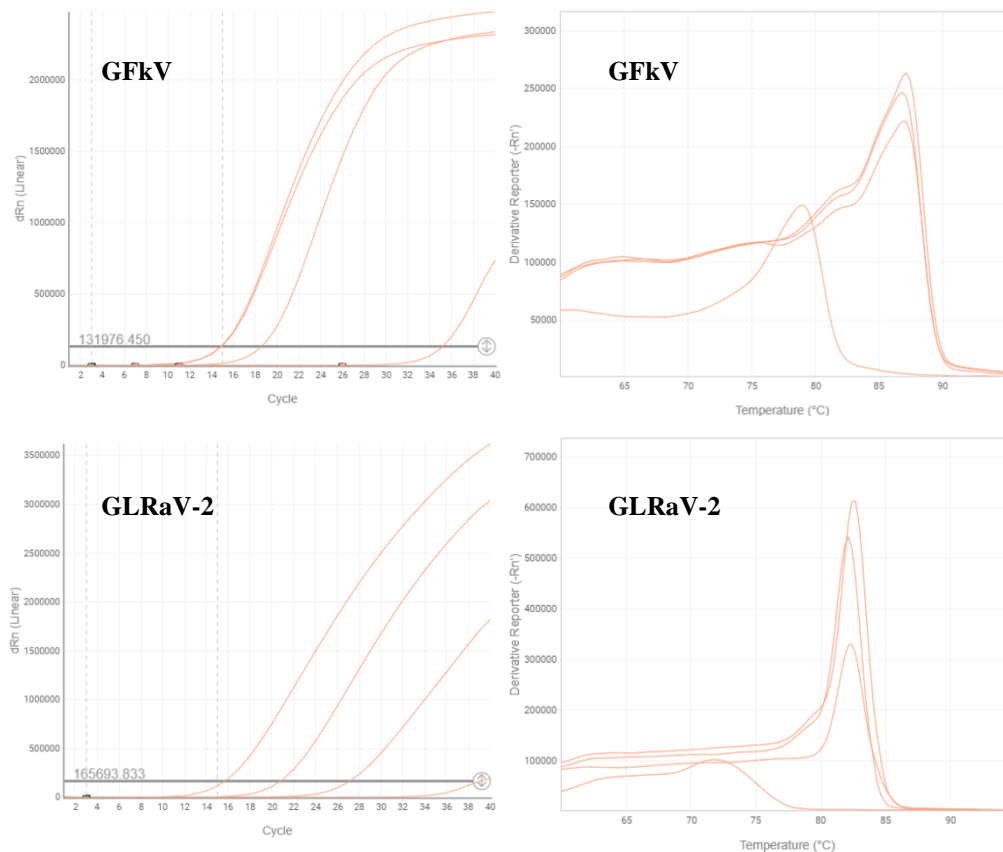
De este modo se consiguió desarrollar y optimizar una técnica de RT-PCR multiplex convencional para el análisis simultáneo de seis de los diez virus que son objeto del presente proyecto en dos reacciones. Esto supone un beneficio para la empresa, por el ahorro de tiempo y reactivos asociados al multiplexado (Osman et al., 2013).

#### 4.4. RT-PCR a tiempo real (RT-qPCR)

##### 4.4.1. RT-qPCR con SYBR-Green

La eficacia de los cebadores del grupo 3 (ArMV, TBRV, RpRSV y COX), que como se comentaba anteriormente, no pudo valorarse por RT-PCR convencional debido a su pequeño tamaño de producto amplificado, y de los cebadores diseñados de *novo* para GFkV y GLRaV-2 se evaluó utilizando los reactivos SYBR-Green. De esta forma se podría hacer una primera evaluación de las parejas de cebadores diseñados sin la necesidad de utilizar sonda Taqman, reactivo que encarece la puesta a punto de la tecnología.

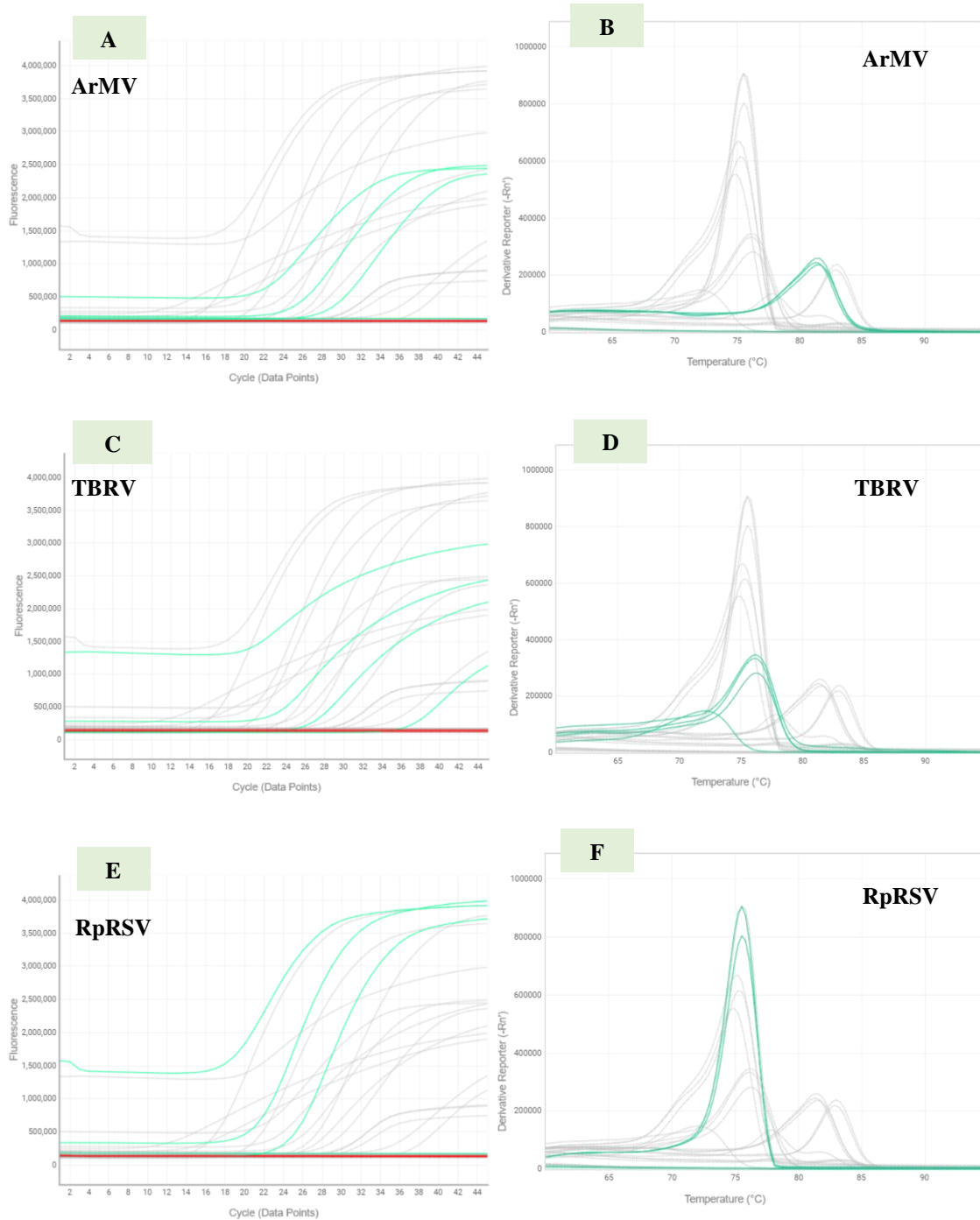
En la Figura 3 se muestran las curvas de fluorescencia relativa a la amplificación de los virus GFkV y GLRaV-2 y las curvas de melting (o disociación) del producto amplificado. Las curvas de amplificación muestran una tendencia asintótica adecuada, aunque para GLRaV-2 se debería aumentar el número de ciclos para visualizarlo mejor. En los gráficos de las curvas de disociación se puede observar el producto amplificado con una temperatura de melting ( $T_m$ ) de unos 83°C para ambos virus y un pequeño pico con una  $T_m$  de 78 y 72°C para GFkV y GLRaV-2, respectivamente que se debe a primer dimer (Harper et al., 2011).



**Figura 3.** Curvas amplificación (izquierda) y de melting o disociación (derecha) de GFkV (arriba) y de GLRaV-2 (abajo).

En la Figura 4 aparecen las curvas de fluorescencia relativa a la amplificación y las de melting del producto amplificado relativas a cada uno de los virus del grupo 3 (ArMV, TBRV y RpRSV). En base a estos resultados se puede afirmar que todos los cebadores funcionan adecuadamente, con una tendencia asintótica de las gráficas de amplificación y una  $T_m$  de unos 83°C para el producto amplificado de ArMV y de unos 77°C para los de TBRV y RpRSV. Solo se observa primer dimer en el caso de TBRV donde la señal que aparece en el control negativo se corresponde con una  $T_m$  de unos 73°C, inferior a la de los controles positivos.

El producto de primer dimer es el que produce fluorescencia en los controles negativos de GFkV, GLRaV-2 y ArMV, a ciclos superiores a los que se detectan los controles positivos. El hecho de que a ciclos elevados, cuando se utiliza SYBR-Green, el primer dimer pueda emitir fluorescencia puede dar lugar a falsos positivos. Es por ello que las amplificaciones por qPCR monitorizadas con sondas suponen una aproximación que evita la aparición de falsos positivos por formación de dímeros entre los cebadores.



**Figura 4.** Curvas amplificación (A, C, E) y de melting (B, D, F) de los virus del grupo 3: ArMV (A, B), TBRV (C, D) y RPRSV (E, F).

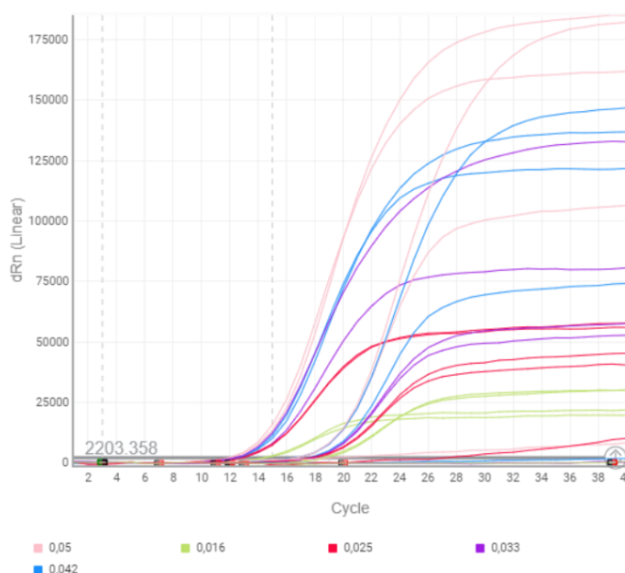
#### 4.4.2. RT- qPCR singleplex

El tercer subobjetivo del presente proyecto es la optimización de una RT-PCR multiplex a tiempo real para la detección de los virus de vid. Para ello, el primer paso que se realizó fue comprobar que las sondas TaqMan diseñadas para cada pareja de cebadores funcionaba correctamente de forma individual (singleplex).

Se realizaron varias pruebas hasta optimizar cada reacción. Los cebadores se testaron a dos concentraciones 100 y 400 nM, la fase de alineamiento a 59°C durante 40 y 30 s y se probaron varias concentraciones de sonda (0.2, 0.1 y 0.05 µM). Las condiciones de reacción óptimas para cada virus individualmente son diferentes y se enumeran a continuación:



- La etapa de alineamiento óptima para SLRSV fue de 40 s a 59°C. Para el resto hubo que reducir esta fase a 30 s.
- GVA solo funcionaba utilizando un programa concreto (Tabla 7), lo que impidió agruparla por RT-qPCR multiplex con otros virus.
- La concentración de cebadores óptima para GVA, GFLV y SLRSV fue de 100nM. La detección del resto de virus funcionó mejor utilizando una 400 nM de los cebadores directo y reverso.
- La concentración de sonda que mejores resultados generaba era la más elevada de las testadas (0.2  $\mu$ M) para todos los virus a excepción de los del grupo 3, que funcionaban mejor a 0.1  $\mu$ M y de GFLV, cuya sonda generaba una señal considerablemente superior al resto, por lo que hubo que testarla en condiciones menos favorables para igualar su intensidad de emisión con la del resto de sondas de su mismo grupo. En la Figura 5, en la que se muestra la gráfica obtenida al utilizar concentraciones decrecientes de la sonda de GFLV (desde 0.05 a 0.016  $\mu$ M), se observa como al disminuir la concentración de sonda disminuye la intensidad de emisión.



**Figura 5.** Resultados de RT-qPCR para GFLV utilizando una concentración final de cebadores de 100 nM y un gradiente de concentración de sonda, representado en diferentes colores (leyenda). Para cada cóctel se testaron 5 reacciones, dos con el control positivo, dos con una dilución 1/10 del mismo y una con control negativo.

El gen COX, que se usó como control interno, permitió valorar la presencia de inhibidores en el ARN extraído dando lugar a un producto de reacción específico en todos los extractos vegetales. Los valores máximos admisibles de  $C_t$  para el control interno es de 20, si se alcanzan valores superiores en el control interno, es necesario repetir la extracción y el análisis (Osman et al., 2008). Para todos los controles se obtuvieron buenos resultados en la amplificación de este gen.

Estas reacciones de qPCR permitieron comprobar la eficacia de los cebadores y sondas diseñados para la detección de cada uno de los virus individualmente. Así mismo, pueden resultar útiles para testar en una determinada muestra la presencia de uno de los virus y no del resto.

Los programas de PCR optimizados para cada caso aparecen en la Tabla 5 y los cócteles en la Tabla 6.

**Tabla 5.** Programa de reacción de RT-qPCR multiplex para cada uno de los grupos.

Virus	Programa RT-qPCR singleplex	
SLRSV	45°C 10 min	X40
	95°C 10 min	
	95°C 30 s	
	59°C 40 s	
	72°C 40 s	
GVA	45°C 10 min	X40
	94°C 10 min	
	94°C 30 s	
	60°C 45 s	
	72°C 1 min	
Restantes	45°C 10 min	X40
	95°C 10 min	
	95°C 30 s	
	59°C 30 s	
	72°C 40 s	

#### 4.4.3. RT- qPCR multiplex

Teniendo en cuenta que los programas de RT-qPCR y los cócteles de reacción a los que mejor se detecta cada virus de forma individual son variables, hubo que hacer varias pruebas para determinar las condiciones más óptimas para cada uno de los grupos. En primer lugar, para agrupar los virus en las mismas reacciones de RT-qPCR hubo que aumentar el volumen final de reacción para poder adicionar tres parejas de cebadores simultáneamente. Teniendo en cuenta las concentraciones que mejores resultados generaban las parejas de cebadores y sondas individualmente (Tablas 6), se hicieron varias pruebas para ajustar las mejores condiciones referentes a cada grupo. Se testaron tres concentraciones diferentes de sonda 0.2, 0.15 y 0.1  $\mu\text{M}$  y otras tres de cebadores directo y reverso 400, 200 y 100 nM. El cóctel de reacción optimizado para cada grupo se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Cóctel de reacción optimizado para cada reacción de RT-qPCR singleplex (izquierda) y multiplex (derecha).

Reactivo	Cóctel RT-qPCR singleplex				Cóctel RT-qPCR multiplex		
	GVA/SLRSV	GFLV	ArMV/TBRV/ RpRSV	GLRaVs/ GFkV	Grupo1	Grupo2	Grupo3
2XBuffer ( $\mu\text{L}$ )	2X	2X	2X	2X	2X	2X	2X
Cebador directo (nM)	100	100	400	400	400	330	320
Cebador reverso (nM)	100	100	400	400	400	330	320
Sondas ( $\mu\text{M}$ )	0.2	0.025	0.1	0.2	0.2 y 0.1(S- GFLV)	0.3	0.12
Enzimas 25X ( $\mu\text{L}$ )	25X	25X	25X	25X	25X	25X	25X
ARN ( $\mu\text{L}$ /control)	2	2	2	2	1.5	1.5	1.5
Volumen final ( $\mu\text{L}$ )	12	12	12	12	25	25	25

Los programas de partida utilizados fueron los que mejor funcionaban para RT-PCR multiplex convencional, eliminado la fase final de elongación de 7 min, que no es necesaria en la qPCR

(Tabla 7). La RT-qPCR para el grupo 3 fue la que más se logró optimizar, tal y como se muestra en la Tabla 7, juntando la fase elongación y alineamiento de cada ciclo (1 min a 60°C), y reduciendo la de desnaturalización a 10 s, lo que permite completar la reacción en menos tiempo que para el resto de grupos. Así mismo, la concentración de reactivos utilizada es inferior (Tabla 6), lo que supone un ahorro importante para la empresa.

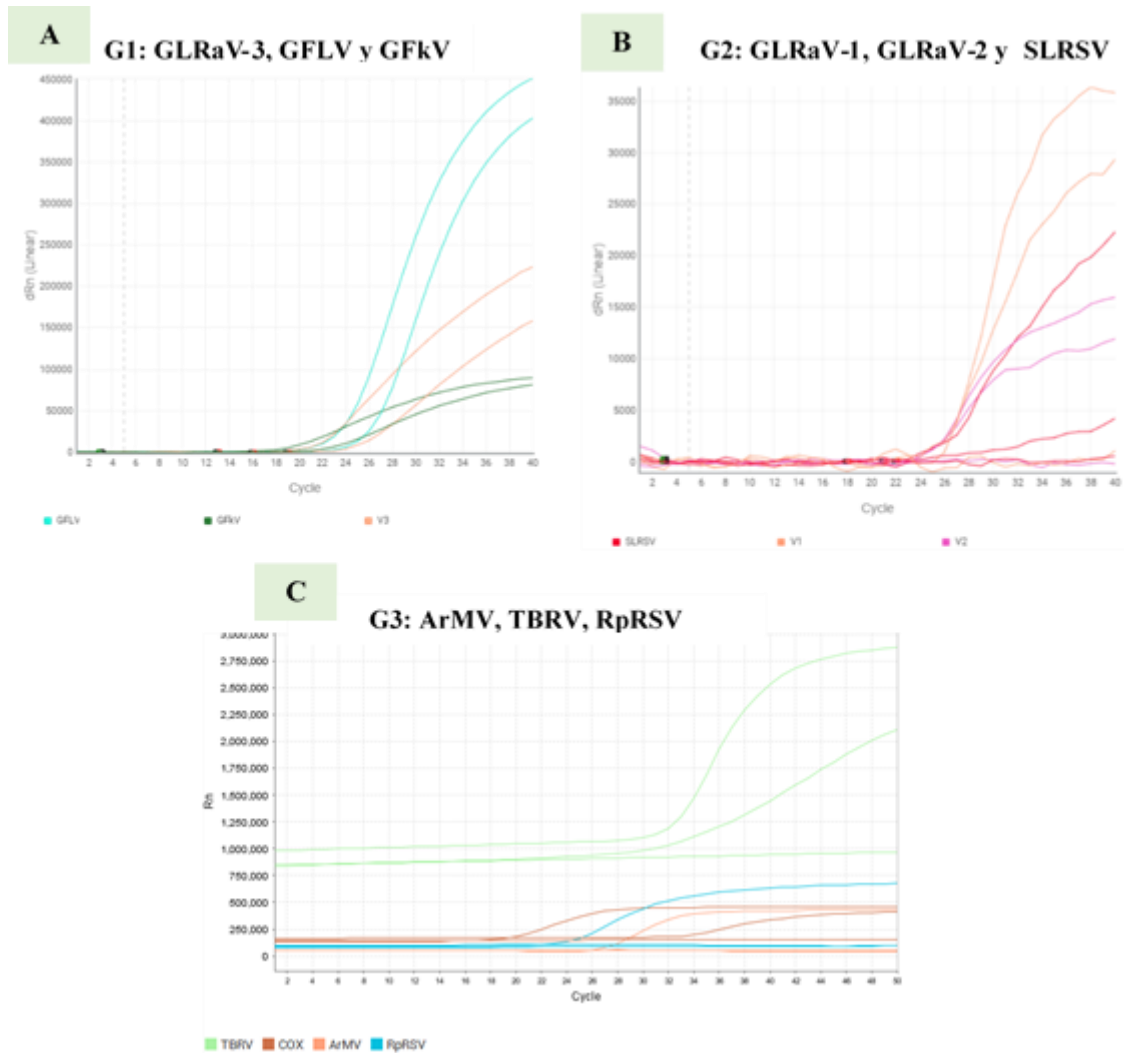
**Tabla 7.** Programa de reacción para cada RT-PCR convencional y RT-qPCR multiplex.

Grupo	Virus	RT-PCR convencional	RT-qPCR
1	GFkV GFLV GLRaV-3	45°C 10 min	45°C 10 min
		94°C 10 min	94°C 10 min
		94°C 30 s	94°C 30 s
		60°C 45 s	60°C 45 s
		72°C 1 min	72°C 1 min
		72°C 7 min	-
2	GLRaV-1 GLRaV-2 SLRSV	45°C 10 min	45°C 10 min
		95°C 10 min	95°C 10 min
		95°C 30 s	95°C 30 s
		59°C 30 s	59°C 30 s
		72°C 40 s	72°C 40 s
		72°C 7 min	-
3	ArMV RpRSV TBRV COX	-	45°C 10 min
			95°C 10 min
			95°C 10 s
			60°C 1 min

En la Figura 6 se muestran las gráficas del multiplexado de cada uno de los grupos. La gráfica A corresponde con el grupo 1 (GLRaV-3, GFLV y GFkV), en la que se observa como todos los virus amplifican con valores de  $C_t$  en torno a 16-22 ciclos, siendo aproximadamente 3 ciclos superior en los controles diluidos respecto a los concentrados. Además, todas las curvas mostraban una tendencia asintótica, tal y como cabía esperar..

En la gráfica B se muestran los resultados para el grupo (GLRaV-1 y -2 y SLRSV). En este caso, aunque todas las sondas generaban señal de  $C_t$  entre 22 y 25 ciclos y las curvas muestran tendencia asintótica, no están tan definidas como en el caso anterior. Una posible explicación puede ser que el programa utilizado no sea el más óptimo o que exista competencia entre las reacciones que tienen lugar simultáneamente.

Los resultados del grupo 3 (ArMV, TBRV, RpRSV y COX) aparecen representados en la gráfica C. Se puede afirmar que las extracciones han funcionado bien porque el gen COX amplifica bien. Se observa que la señal correspondiente al control positivo de TBRV presenta valores de  $C_t$  en torno a 30 ciclos, más altos que los del resto, lo que se debe a que este virus está más diluido en la muestra vegetal de partida. Puede afirmarse que en conjunto, este grupo funciona adecuadamente.



**Figura 6.** Gráficas de amplificación en las que se muestra el resultado final de las reacciones de RT-PCR multiplex para cada grupo. A se corresponde con el **Grupo 1** (GLRaV-1, GFLV y GFkV), B con el grupo 2 (GLRaV-1, 2 y SLRSV) y C con el grupo 3 (ArMV, TBRV y RpRSV). En la leyenda de cada gráfica se indica que curva corresponde a cada virus.

GVA, no pudo ser incluido en ningún grupo porque las condiciones de amplificación de sus cebadores y sondas individualmente no encajaban con las del resto. Por lo tanto, este virus la detección solo se optimizó por RT-PCR singleplex. Una futura aproximación podría ser tratar de diseñar cebadores directo y reverso y sondas de *novo* de modo que teóricamente se puedan incluir en alguno de los grupos 1 y 2.

En la Tabla 8 se comparan los valores de  $C_t$  que se generan para cada virus en las reacciones de RT-qPCR singleplex y multiplex desarrolladas, utilizando los mismos controles positivos y realizando las reacciones en paralelo, con la misma alícuota de buffer y enzima para reducir variabilidad. Se observa un aumento generalizado en los valores de  $C_t$  para RT-PCR multiplex, algo común en este tipo de análisis (Osman, Hodzic, & Omanska-klusek, 2013), pero las diferencias son de menos de un ciclo en la mayoría de casos. Cabe señalar que RpRSV es el que más variación muestra en función a la técnica con la que se analice.

**Tabla 8.** Comparación de los valores de  $C_t$  obtenidos para la detección de cada virus de forma individual o en conjunto.

Controles	Singleplex	Multiplex	$\Delta C_t$
GLRaV-1	24.72	25.71	1.00
GLRaV-2	22.17	22.84	0.67
SLRSV	24.51	24.27	-0.24
GLRaV-3	21.87	22.28	0.42
GFLV	17.11	16.41	-0.70
GFkV	19.63	20.77	1.14
ArMV	24.24	25.27	1.03
TBRV	19.03	19.52	0.49
RpRSV	26.35	28.38	2.03
COX	20.26	21.20	0.94

Cada reacción se repitió al menos tres veces, utilizando en cada réplica cada control por duplicado. Los resultados permiten comprobar en el grupo 2, la repetitividad era baja con respecto a los otros dos. Ello puede ser debido a la mayor inestabilidad en la captación de señal observada en la gráfica B de la Figura 6. Teniendo en cuenta esto, la tendencia de las gráficas y las diferencias en los valores de  $C_t$  con respecto a la RT-qPCR, se puede afirmar que los grupos 1 y 3 se han podido optimizar mejor que el grupo 2.

#### 4.5. Comparación de las tecnologías desarrolladas

En el presente proyecto se han tratado de optimizar dos tecnologías de diagnóstico para los principales virus patógenos que afectan a vid, una basada en RT-PCR convencional y otra en RT-qPCR.

Se analizaron los resultados obtenidos utilizando cada una de las tecnologías para la detección de cada virus por separado y en conjunto. Para ello, se usó cada control positivo de forma individual y una mezcla de todos ellos, respectivamente. En la Tabla 9 aparecen los resultados obtenidos al testar cada una de las técnicas con los controles positivos de los virus del grupo 1 (GLRaV-3, GFLV Y GFkV). Se observa que cuando se analizó cada control de forma individual el resto de virus no se detectan, salvo en el control de GFkV, que era positivo para GLRaV-3 también. Cuando se analizaron todos los controles en conjunto, todos amplificaban, independientemente de la tecnología utilizada, además en el caso de qPCR, los valores de los ciclos a los que se detectan son similares a los obtenidos individualmente. En los controles negativos no se detectó producto de PCR.

**Tabla 9.** Comparación de las técnicas de RT-PCR multiplex convencional y en tiempo real desarrolladas para el grupo 1 (GLRaV-3, GFLV, GFkV). Los datos de la RT-PCR multiplex convencional se representan con los signos + o - en caso positivo o negativo, respectivamente. Para la RT-qPCR multiplex se ha calculado el valor promedio de los valores  $C_t$  obtenidos en cada réplica de cada reacción.

Controles	Multiplex RT-PCR convencional			Multiplex RT-qPCR		
	GLRaV-3	GFLV	GFkV	GLRaV-3	GFLV	GFkV
GLRaV-3	+	-	-	27.94	-	-
GFLV	-	+	-	-	17.11	-
GFkV	+	-	+	21.87	-	19.63
Todos	+	+	+	22.28	16.41	20.77
Negativo	-	-	-	-	-	-

En la Tabla 10 aparecen los datos relativos a las tecnologías de RT-PCR multiplex convencional y en tiempo real, desarrolladas para la detección de los virus que forman parte del grupo 2 (GLRaV-1, 2 y SLRSV). Se puede afirmar que ambas tecnologías funcionaron según lo esperado, pues se obtuvieron resultados positivos solo en presencia de los controles de cada virus, y manteniendo unos valores de  $C_t$  similares, en el caso de RT-qPCR, cuando se analizan los controles positivos individualmente o conjuntamente. En los controles negativos, los resultados fueron negativos.

**Tabla 10.** Comparación de las técnicas de RT-PCR multiplex convencional y en tiempo real desarrolladas para el grupo 3 (GLRaV-1, GLRaV-2, SLRSV). Los datos de la RT-PCR multiplex convencional se representan con los signos + o – en caso positivo o negativo, respectivamente. Para la RT-qPCR multiplex se ha calculado el valor promedio de los valores  $C_t$  obtenidos en cada réplica de cada reacción.

Controles	Multiplex RT-PCR convencional			Multiplex RT-qPCR		
	GLRaV-1	GLRaV-2	SLRSV	GLRaV-1	GLRaV-2	SLRSV
GLRaV-1	+	-	-	24,72	-	-
GLRaV-2	-	+	-	-	22,17	-
SLRSV	-	-	+	-	-	24,51
Todos	+	+	+	25,71	22,84	24,27
Negativo	-	-	-	-	-	-

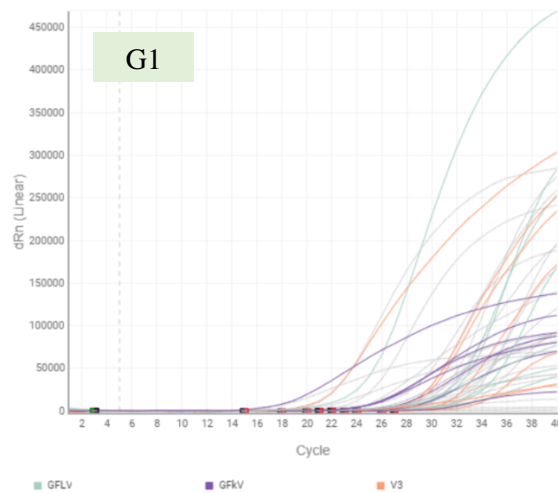
Los datos mostrados permiten afirmar que ambas tecnologías de RT-PCR desarrolladas, tanto convencional como cuantitativa, permiten detectar los virus de forma individual y una mezcla de todos ellos con eficacia. En ninguna de las dos tecnologías se detectó reactividad cruzada cuando solo se usaba un control positivo por reacción, excepto para el control de GFkV, que también es positivo para GLRaV-3, debido a un error del fabricante. Cabe señalar que el valor de  $C_t$  al que se detecta cada virus varía, ya que cada uno se encuentra a una concentración diferente en la planta.

#### 4.6. Pruebas de sensibilidad

Algunos estudios demuestran que puede haber falsos negativos en reacciones de RT-PCR aunque el control interno amplifique. Esto puede deberse a que la cantidad de ARN vegetal sea muy superior al viral, algo común en viña (Constable & Rodoni, 2011). Por ello, es necesario estudiar el rango dinámico de concentraciones en el que la tecnología planteada es efectiva. Para comprobar la eficacia de la combinación de cebadores y sondas a bajas niveles de infección viral, se usaron diluciones seriadas de factor 10 de los controles positivos.

La eficiencia para la detección fue calculada solo para el grupo 1, pues por falta de tiempo no pudo abordarse este análisis para el resto de grupos. En la Figura 7, donde aparecen representadas las curvas de amplificación obtenidas para cada dilución, se observa como a medida que aumenta la dilución de cada control, la señal aparece a ciclos más tardíos. El rango dinámico lineal de este grupo cubre cuatro órdenes de magnitud, algo adecuado para este tipo de reacciones (Bustin et al., 2009). El mejor valor el obtenido de eficiencia fue de una unidad para GFLV. Para el GLRaV-3 y GFLV la eficiencia fue de 0.5.

Aunque este análisis solo haya podido ser realizado para uno de los tres grupos de RT-qPCR multiplex planteados, en futuras pruebas, a fin de completar la optimización de la técnica de diagnóstico desarrollada en el presente proyecto, se realizará para el resto.

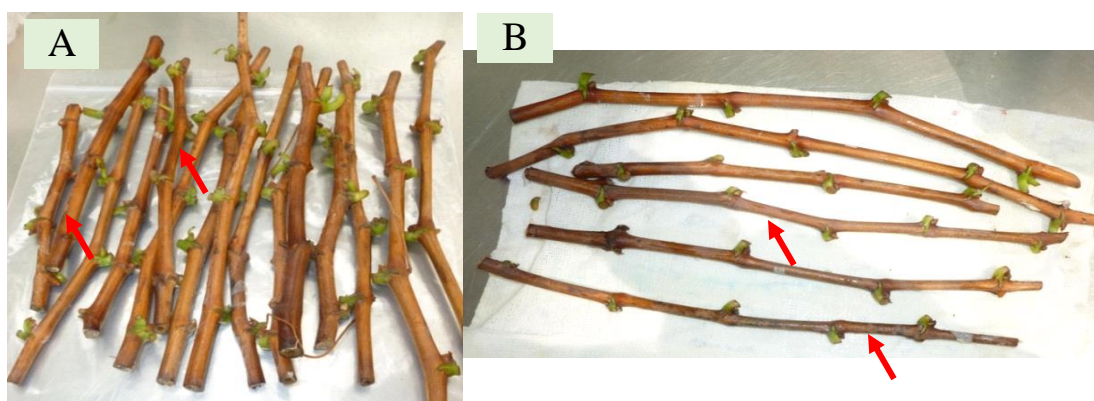


**Figura 7.** Curvas de amplificación obtenidas para cada uno de los virus del grupo 1 en las diluciones seriadas de factor 10 de los controles positivos. Cada virus aparece representado con un color diferente, indicado en la leyenda de la figura.

#### 4.7. Aplicación de la tecnología a material de campo y validación

Un total de 44 plantas de diferentes orígenes y variedades se sometieron un análisis fitopatológico para testar las tecnologías desarrolladas. En primer lugar, tras la recepción, las plantas se examinaron visualmente y se vio que diez de ellas presentaban la sintomatología característica de entrenudo corto que produce GFLV a nivel de tallo (Figura 8), el resto no mostraban sintomatología particular. La detección visual no suele ser suficiente, ya que las plantas asintomáticas pueden resultar positivas en test moleculares (Constable & Rodoni, 2011).

Las muestras se testaron con los cebadores propuestos en este proyecto para su validación, utilizando los mismos programas de PCR y cócteles de reacción optimizados para controles positivos, adicionando BSA 0.1%, que reduce los efectos de los posibles agentes inhibitorios que puedan haber sido arrastrados durante la extracción. De forma paralela, las muestras se analizaron con los protocolos de diagnóstico que hasta la fecha estaba utilizando ValGenetics (en su mayoría PCRs convencionales sin multiplexar).



**Figura 8.** Fotografías del material vegetal con sintomatología típica de la enfermedad el entrenudo corto utilizado para testar las tecnologías de diagnóstico desarrolladas en este proyecto. A. Varetas recibidas en ValGenetics de variedad X; B. Varetas recibidas en ValGenetics de la variedad Y. Las flechas señalan entrenudos cortos.

Los datos obtenidos y comentados a continuación pueden consultarse en el Anexo 1:

- Diez de las 44 plantas analizadas resultaron positivas para GLRaV-3. Estos datos son equivalentes a los que se obtuvieron analizando las mismas muestras con las técnicas que se estaban utilizando en la empresa hasta la fecha. Además, 9 de las 44 plantas mostraban resultados dudosos con las tecnologías utilizadas anteriormente en la empresa, pero la estrategia desarrollada en este proyecto permitió confirmar que eran negativas. El 23 % de las plantas analizadas, por tanto eran positivas para este virus.
- En el caso de GFLV, 10 de las 44 plantas analizadas resultaron positivas por RT-qPCR multiplex, con valores  $C_t$  en torno a 30 ciclos, relativamente tardíos, lo que implicaría que el virus se encuentra a concentraciones bajas en la planta. Los resultados que se obtuvieron cuando las mismas muestras fueron analizadas por RT-PCR multiplex convencional y con las otras técnicas que anteriormente se utilizaban en la empresa fueron negativos. Esto demuestra que para este virus se ha conseguido mejorar la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico de las que hasta la fecha se hacía uso en ValGenetics SL.
- Todas las plantas analizadas para GFkV resultaron negativas por RT-PCR convencional, pero diez fueron positivas con las tecnologías utilizadas hasta la fecha por la empresa. Los cebadores publicados que se pretendían utilizar en la tecnología de RT-PCR convencional en este proyecto son los propuestos por Osman et al., 2008. La discrepancia encontrada entre los resultados llevó a diseñar de *novo* los cebadores utilizados para detectar este virus. Una vez optimizados los nuevos cebadores se volvieron a analizar las muestras de campo, por RT-qPCR, y se obtuvieron resultados positivos concluyentes para siete muestras, con valores  $C_t$  en torno a 30 ciclos. De las tres muestras restantes una no pudo volver a ser testada por falta de material y las otras dos volvieron a mostrar resultados negativos. Aunque en una primera aproximación no se obtuvieron resultados adecuados, al rediseñar los cebadores se mejoró. Aun así, no se logró una eficacia del cien por cien.
- Los análisis por RT-qPCR para GLRaV-1 y SLRSV indicaron que dos de las plantas analizadas eran positivas para estos virus. Existe discrepancia con respecto a los resultados obtenidos por RT-PCR convencional y con las técnicas de la empresa, pues esas mismas muestras positivas se habían considerado negativas. La detección, igual que para GFLV, a ciclos tardíos, por lo que se puede afirmar que en este caso también se mejora la sensibilidad.
- Todas las plantas analizadas resultaron negativas para GLRaV-2 con la nueva tecnología de RT-PCR convencional desarrollada. Esta prueba se realizó tratando de utilizar los cebadores propuestos por Osman et al., 2007. Con las técnicas de la propia empresa nueve plantas resultaron positivas. La discrepancia de resultados llevó a diseñar de *novo* los cebadores utilizados para la detección de este virus, e igual que como se ha mencionado para GFkV, se volvieron a analizar las muestras de campo por RT-qPCR. Solo se obtuvieron resultados positivos concluyentes para dos de las muestras (5 y 25). Queda pendiente para próximos trabajos el secuenciar mediante la tecnología Sanger los productos de PCR obtenidos con la tecnología utilizada hasta la fecha por la empresa, para descartar que se trate de falsos positivos.
- Para el grupo 3 (resultados no mostrados), no se encontró ninguna muestra de campo positiva. El control interno COX, permitió comprobar que el material genético



utilizado en todas las pruebas era de calidad y que por tanto los resultados obtenidos no eran falsos negativos. En los casos en los que los valores de  $C_t$  fueron superiores al valor aceptado (20), se repitió la extracción, tal y como recomiendan Osman et al., 2007 (Osman et al., 2007).

En análisis de muestras de campo comparando la técnica desarrollada con otras optimizadas, muestra resultados favorables en el caso de GLRaV-1, SLRSV y GFLV, para los que se ha mejorado lo existente previamente. Para GLRaV-3, los resultados son equivalentes para todas las técnicas, por lo que las técnicas desarrolladas en este proyecto se pueden aplicar a material de campo. Para GLRaV-2 y GFkV, la discrepancia entre resultados encontrada ha permitido detectar fallos en el diseño de cebadores. Por último, para el grupo 3 no se tiene muestras positivas, por lo que no se puede determinar con seguridad si los cebadores permiten o no la detección de los virus en este tipo de material.

## 5. CONCLUSIONES

- Se ha conseguido desarrollar una técnica de diagnóstico rápida, sensible y reproducible para los grupos 1 y 3 por RT-qPCR y para el grupo 2 por RT-PCR convencional. Así como para GVA individualmente.
- Se ha puesto a punto un sistema de diagnóstico multiplex por RT-PCR convencional que permite la detección simultánea de los virus que se incluyen en el grupo 1 (GLRaV-3, GFLV y GFkV) y en el grupo 2 (GLRaV-1, GLRaV-2 y SLRSV) atendiendo al tamaño de amplificado.
- El diseño teórico ha resultado ser un paso clave para el correcto funcionamiento práctico de las tecnologías desarrolladas. Así mismo, la temperatura y tiempo de alineamiento, los tiempos de elongación, las concentraciones de cebadores y sonda han sido factores decisivos en el proceso de optimización de la PCR multiplex, tanto convencional como cuantitativa.
- Los resultados obtenidos por RT-qPCR singleplex para los virus de los grupos 1, 2 y 3 son extrapolables a los obtenidos para la RT-qPCR multiplex, aunque se observa un retraso en la detección de aproximadamente un ciclo.
- Se ha demostrado mediante el análisis de diluciones seriadas del control positivo viral que para el grupo 3 (GLRaV-3, GFLV y GFkV) el sistema de diagnóstico de RT-qPCR multiplex planteado presenta una sensibilidad adecuada, ya que el rango dinámico lineal cubre cuatro órdenes de magnitud.
- La validación de los sistemas de diagnóstico con muestras de campo se hace imprescindible ya que ha permitido detectar fallos en el diseño de cebadores de los virus GFkV y GLRaV-2.
- El uso de SYBR-Green para el análisis preliminar en las RT-qPCRs ha resultado eficaz, ya que permite analizar el funcionamiento de los cebadores a tiempo real sin el desembolso económico que supone el uso de sondas marcadas fluorométricamente. Sin embargo, presenta el inconveniente de que puede ocasionar falsos positivos por la señal de amplificación de heterodímeros a ciclos elevados.
- No se ha observado solapamiento en la detección de los espectros de emisión de los distintos fluoróforos utilizados (FAM, CY5, VIC y JUN) en las tecnologías de RT-qPCR desarrolladas para los grupos 1, 2 y 3.
- La dificultad de encontrar controles positivos para algunos virus (GVB) hace presente la necesidad de la creación de colecciones públicas de virus de fácil acceso para las empresas privadas.
- El control interno COX ha sido de gran utilidad para asegurar la ausencia de inhibidores de la PCR en las muestras analizadas.

## 6. REFERENCIAS

- ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BAR-JOSEPH, M.; BRUNT, A. A.; CANDRESSE, T.; FOSTER, G. D.; MARTELLI, G.P.; MILNE, R.G. & FAUQUET, C. M. (2004). Virology Division News: The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, 149(5), 1045-1060. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0304-0>
- ANGELINI, E.; ABOUGHANEM-SABANADZOVIC; N., DOLJA, V. V. & MENG, B. (2017). Grapevine leafroll-associated virus 2. En *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing. Switzerland: 141-166. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7>
- BALTIMORE, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological reviews*, 35(3), 235-241.
- BERTAZZON, N.; BORGIO, M.; VANIN, S. & ANGELINI, E. (2010). Genetic variability and pathological properties of Grapevine Leafroll-associated Virus 2 isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 127(2), 185-197. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9583-3>
- 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(3), 283-287. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9663-4>
- BIOREBA. Product Information: DAS-ELISA. Grapevine leafroll-associated virus 1+3 (GLRaV-1+3), visto en junio de 2018 <http://www.bioreba.com/index.php?idpage=2&CatID=1&ProduktID=101.01&artAbbr=GLRaV-1+2>
- BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO (BOE) que recoge la DIRECTIVA 2000/29/CE del consejo de 8 de mayo de 2000 relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad.
- BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO (BOE) que recoge la LEY 43/2002 de 20 de noviembre, de sanidad vegetal.
- BOOKOUT, A. L.; CUMMINS, C. L.; MANGELSDORF, D. J.; PESOLA, J. M. & KRAMER, M. F. (2006). High-Throughput Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR. *Current protocols in Molecular Biology*, 73(1), 15.8.1-15.8.28.
- BROWN, D. J. F.; TRUDGILL, D. L. & ROBERTSON, W. M. (1996). Nepoviruses: Transmission by Nematodes. En *The plant Viruses*. Springer International Publishing. United Kingdom. (5.<sup>a</sup> ed., pp. 187-209)
- BRUISSON, S.; LEBEL, S.; WALTER, B.; PREVOTAT, L.; SEDDAS, S. & SCHELLENBAUM, P. (2017). Comparative detection of a large population of grapevine viruses by TaqMan®RT-qPCR and ELISA. *Journal of Virological Methods*, 240, 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.003>
- BURGER, J. T.; MAREE, H. J.; GOUVEIA, P. & NAIDU, R. A. (2017). Grapevine leafroll-associated virus 3. En *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing. Switzerland: 167-196 <https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7>
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M., MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, w.f.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J & WITTEWER, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication

- of Quantitative Real-Time Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 661-662.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- CAMBRA, M.; GORRIS, M. T.; CAMARASA, E.; ROMÓN, M. P.; NARVÁEZ, G.; TERRADA, M. E. & MARTÍNEZ, M. C. (1999). Inmunoimpresión-ELISA: método ideal para detección del virus de la tristeza de los cítricos. *Comunitat Valenciana agraria*, (13), 4-14.
- CONSTABLE, F. E.; CONNELLAN, J.; NICHOLAS, P. & RODONI, B. C. (2012). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays and reverse transcription-polymerase chain reaction for the reliable detection of Australian grapevine viruses in two climates during three growing seasons. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(2), 239-244. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00188.x>
- CONSTABLE, F. & RODONI, B. (2011). Grapevine fleck and associated viruses. *Wine Australia Factsheet*, 1-3.
- CRESPO, A.; CARRALERO, A.; PLOMER, M.; CERVERA, M. & ALBIACH, M. R. (2015). Diagnóstico integral de enfermedades de viña: desde la técnica elisa a la metagenómica. *Fitoma España*, 274, 146-148,
- DIGIARO, M.; ELBEAINO, T. & MATELLI, G. P. (2017). Grapevine fanleaf virus and Other Old World Nepoviruses. En *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing. Switzerland: 47-82.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7>
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO) GLOBAL DATA BASE, visto en abril y mayo de 2018. <https://gd.eppo.int/taxon/>
- FEDERACIÓN ESPAÑOLA DEL VINO (FEV) 2018. El sector, visto en mayo de 2018, [http://www.fev.es/v\\_portal/apartados/apartado.asp?te=29](http://www.fev.es/v_portal/apartados/apartado.asp?te=29)
- HABILI, N.; KOMÍNEK, P. & LITTLE, A. (2007). Grapevine leafroll-associated virus 1 as a common grapevine pathogen. *Plant Viruses*, 1(1), 63-68.
- HARPER, S. J.; DELMIGLIO, C.; WARD, L. I. & CLOVER, G. R. G. (2011). Detection of Tomato black ring virus by real-time one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 171(1), 190-194. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.10.023>
- HOMMAY, G.; KOMAR, V.; LEMAIRE, O. & HERRBACH, E. (2008). Grapevine virus A transmission by larvae of *Parthenolecanium corni*. *European Journal of Plant Pathology*, 121(2), 185-188. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9244-3>
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (INE) (2017). España en cifras 2017. 38 pp. Visto en mayo de 2018.
- INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), visto en mayo de 2018.
- JOŃCZYK, M.; LE GALL, O.; PATUCHA, A.; BORODYNKO, N. & POSPIESZNY, H. (2004). Cloning and sequencing of full-length cDNAs of RNA1 and RNA2 of a Tomato black ring virus isolate from Poland. *Archives of Virology*, 149(4), 799-807.
- LE GALL, O.; LANNEAU, M.; CANDRESSE, T. & DUNEZ, J. (1995). The nucleotide sequence of the RNA-2 of an isolate of the English serotype of tomato black ring virus: RNA recombination in the history of nepoviruses. *Journal of General Virology*, 76(5), 1279-1283. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-5-1279>
- LÓPEZ-FABUEL, I.; WETZEL, T.; BERTOLINI, E.; BASSLER, A.; VIDAL, E.; TORRES, L. B.; YUSTE, A. & OLMOS, A. (2013). Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous

- detection of the five main grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 188(1-2), 21-24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.11.034>
- MACKENZIE, D. J.; MCLEAN, M. A.; MUKERJI, S. & GREEN, M. (1997). Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease*, 81(2), 222-226. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.222>
- MAREE, H.; ALMEIDA, R.; BESTER, R.; CHOOI, K. M.; COHEN, D.; DOLJA, V.; FUCHS, M.F.; GOLINO, D. A.; JOOSTE, A.E. C.; MARTELLI, G. P.; NAIDU, R. A.; ROWHANI, A.; SALDARELLI, P & BURGER, J.T. (2013). Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00082>
- MARMONIER, A.; SCHELLENBERGER, P.; ESMENJAUD, D.; SCHMITT-KEICHINGER C.; RITZENTHALER, C.; ANDRET-LINK, P.; LEMAIRE, O.; FUCHS, M. & DEMANGEAT, G. (2010). The coat protein determines the specificity of virus transmission by *Xiphinema diversicaudatum*. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 275-279.
- MARTELLI, G. P. (2014). Directory of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine and Their Agents. *Journal of Plant Pathology*, 96(1sup), 1-136. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I1SUP>
- MARTELLI, G. P.; ADAMS, M. J.; KREUZE, J. F. & DOLJA, V. V. (2007). Family *Flexiviridae*: A Case Study in Virion and Genome Plasticity. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), 73-100. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094401>
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE (MAPAMA). Información sobre el sector vitivinícola, visto en mayo de 2018 <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/vitivinicultura/>
- MUMFORD, R. (2010). The improvement of diagnostic capabilities for the soft-fruit industry: the development of rapid and sustainable alternatives for strawberry virus testing. *Agriculture and Horticulture Development Board*. The Food & Environment Research Agency (Fera), Sand Hutton, York: SF 84
- MURANT, A. F. & TAYLOR, C. E. (1965). Soil With Chemicals To Prevent Transmission of Tomato Blackring and Raspberry Ringspot Viruses. *Annals of Applied Biology*, 55, 227-237.
- NAIDU, R. A. (2017). Grapevine leafroll-associated virus 1. En *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing. Switzerland: 127-140 [https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_6)
- OLMOS, A.; BERTOLINI, E.; RUIZ-GARC, A. B.; MART, C.; PEIRÓ, R. & VIDAL, E. (2016). Modeling the Accuracy of Three Detection Methods of Grapevine leafroll-associated virus 3 During the Dormant Period Using a Bayesian Approach. *Virology*, 106(5), 510-518. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-15-0246-R>
- OSMAN, F.; HODZIC, E.; OMANSKA-KLUSEK, A.; OLINEKA, T. & ROWHANI, A. (2013). Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of Grapevine virus A, B and D. *Journal of Virological Methods*, 194(1-2), 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.046>
- 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(1), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.035>
- OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D. & ROWHANI, A. (2008). Comparison of

- low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 149(2), 292-299.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.01.012>
- OSMAN, F.; OLINEKA, T.; HODZIC, E.; GOLINO, D. & ROWHANI, A. (2012). Comparative procedures for sample processing and quantitative PCR detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 179(2), 303-310.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.11.008>
- OSMAN, F. & ROWHANI, A. (2006). Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133(2), 130-136.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.11.005>
- OSMAN, F. & ROWHANI, A. (2008). Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of viruses associated with Rugose wood complex of grapevine. *Journal of Virological Methods*, 154(1-2), 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.005>
- PACIFICO, D.; CACIAGLI, P.; PALMANO, S.; MANNINI, F. & MARZACHÌ, C. (2011). Quantitation of Grapevine leafroll associated virus-1 and -3, Grapevine virus A, Grapevine fanleaf virus and Grapevine fleck virus in field-collected *Vitis vinifera* L. «Nebbiolo» by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 172(1-2), 1-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.12.002>
- REAL DECRETO 58/2005 de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros.
- ROWHANI, A.; MANINGAS, M.A.; LILE, L.S.; DAUBERT, S.D. & GOLINO, D.A. (1995). Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilised virions. *Phytopathology*, 85(3), 347-352.
- RWAHNIH, A.M.; DAUBERT, S.; GOLINO, D.; ISLAS, C. & ROWHANI, A. (2015). Comparison of Next-Generation Sequencing Versus Biological Indexing for the Optimal Detection of Viral Pathogens in Grapevine. *Phytopathology*, 105(6), 758-763.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0165-R>
- SABANADZOVIC, S.; ABOUGHANEM-SABANADZOVIC, N. & MARTELLI, G. (2017). Grapevine fleck and similar viruses. En *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing. Switzerland: 331-350  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_16)
- SABANADZOVIC, S.; GHANEM-SABANADZOVIC, A. N.; SALDARELLI, P. & MARTELLI, G. P. (2001). Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine fleck virus. *Journal of General Virology*, 82, 2009–2015.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-010-0908-5>
- TZANETAKIS, I. E.; POSTMAN, J. D.; GERGERICH, R. C. & MARTIN, R. R. (2006). A virus between families: nucleotide sequence and evolution of Strawberry latent ringspot virus. *Virus Research*, 121(2), 199-204. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.06.001>
- WETZEL, T.; EBEL, R.; MOURY, B.; LE GALL, O.; ENDISCH, S.; REUSTLE, G. M. & KRCZAL, G. (2006). Sequence analysis of grapevine isolates of Raspberry ringspot nepovirus. *Archives of Virology*, 151(3), 599-606. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0665-z>
- WETZEL, T.; MEUNIER, L.; JAEGER, U.; REUSTLE, G. M. & KRCZAL, G. (2001). Complete nucleotide sequences of the RNAS 2 of German isolates of Grapevine fanleaf

and Arabis mosaic nepoviruses. *Virus Research*, 75(2), 139-145.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00235-0)

ZHU, H. Y.; LING, K. S.; GOSZCZYNSKI, D. E.; MCFERSON, J. R. & GONSALVES, D. (1998). Nucleotide sequence and genome organization of grapevine leafroll-associated virus-2 are similar to beet yellows virus, the closterovirus type member. *Journal of General Virology*, 79(5), 1289-1298. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-5-1289>

## 7. ANEXOS

## ANEXO 1. Resultados de las pruebas con material de campo

*Tabla 11. Resultados de las pruebas con material de campo por RT-PCR convencional y multiplex con los cebadores del grupo 1 (GLRaV-3, GFLV Y GFkV). Para cada muestra se indica si la reacción a resultado positiva con el signo '+' o con el valor de  $C_t$  en el caso de qPCR. El signo '-' indica resultados negativos y 'No' que no se ha analizado con esa técnica.*

Muestra	GLRaV-3			GFLV			GFkV		
	ValGenetics	RT-PCR convencional	RT-qPCR multiplex	ValGenetics	RT-PCR convencional	RT-qPCR multiplex	ValGenetics	RT-PCR convencional	RT-qPCR multiplex
1	+	+	21.15	-	-	32.56	+	-	32.73
2	+	+	21.73	-	-	31.27	+	-	31.89
3	+	+	24.75	-	-	32.87	+	-	-
4	+	+	21.94	-	-	30.29	+	-	32.25
5	+	+	22.76	-	-	32.74	+	-	-
6	+	+	22.25	-	-	31.32	+	-	30.56
7	+	+	No	-	-	No	+	-	No
8	+	+	22.32	-	-	29.48	+	-	32.45
9	+	+	34.36	-	-	32.91	+	-	30.56
10	+	+	22.32	-	-	30.78	+	-	32.45
11	-	-	No	-	-	No	-	No	No
12	-	-	-	-	-	31.92	-	No	-
13	?	-	No	-	No	No	-	No	No
14	-	-	No	-	No	No	-	No	No
15	?	-	No	-	No	No	-	No	No
16	?	-	No	-	No	No	-	No	No
17	?	-	No	-	No	No	-	No	No
18	-	-	No	-	No	No	-	No	No
19	?	-	No	-	No	No	-	No	No
10	-	-	-	-	No	32.80	-	No	-
21	-	-	No	-	No	No	-	No	No
22	-	-	No	-	No	No	-	No	No
23	?	-	No	-	No	No	-	No	No
24	?	-	No	-	No	No	-	No	No
25	?	-	No	-	No	No	-	No	No
26	?	-	No	-	No	No	-	No	No
27	-	-	No	-	No	No	-	No	No
28	-	-	No	-	No	No	-	No	No
29	-	-	No	-	No	No	-	No	No
30	-	-	No	-	No	No	-	No	No
31	-	-	No	-	No	No	-	No	No
32	-	-	No	-	No	No	-	No	No
33	-	-	No	-	No	No	-	No	No
34	-	-	No	-	No	No	-	No	No
35	-	-	No	-	No	No	-	No	No
36	-	-	No	-	No	No	-	No	No
37	-	-	No	-	No	No	-	No	No
38	-	-	No	-	No	No	-	No	No
39	-	-	No	-	No	No	-	No	No
40	-	-	No	-	No	No	-	No	No
41	-	-	No	-	No	No	-	No	No
42	-	-	No	-	No	No	-	No	No
43	-	No	-	-	No	-	-	No	-
44	-	No	-	-	No	-	-	No	-



**Tabla 12.** Resultados de las pruebas con material de campo por RT-PCR convencional y multiplex con los cebadores del grupo 2 (GLRaV-1, GLRaV-2 y SLRSV). Para cada muestra se indica si la reacción a resultado positiva con el signo '+' o con el valor de  $C_t$  en el caso de qPCR. El signo '-' indica resultados negativos y 'No' que no se ha analizado con esa técnica.

Muestra	GLRaV-1			GLRaV-2			SLRSV		
	ValGenetics	RT-PCR convencional	RT-qPCR multiplex	ValGenetics	RT-PCR convencional	RT-qPCR multiplex	ValGenetics	RT-PCR convencional	RT-qPCR multiplex
1	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-	-	?	-	-
3	-	-	-	+	-	-	?	-	-
4	-	-	No	-	-	No	-	-	No
5	-	-	24.52	+	-	17.39	?	-	20.28
6	-	-	-	+	-	-	-	-	-
7	-	-	-	+	-	-	-	-	-
8	-	-	-	+	-	-	-	-	-
9	-	-	-	+	-	-	-	-	-
10	-	-	-	+	-	-	-	-	-
11	-	-	No	-	-	No	-	-	No
12	-	-	No	-	-	No	-	-	No
13	-	No	No	-	-	No	-	No	No
14	-	No	No	-	-	No	-	No	No
15	-	No	No	-	-	No	-	No	No
16	-	No	No	-	-	No	-	No	No
17	-	No	No	-	-	No	-	No	No
18	-	No	No	-	-	No	-	No	No
19	-	No	No	-	-	No	-	No	No
10	-	No	No	-	-	No	-	No	No
21	-	No	No	-	-	No	-	No	No
22	-	No	No	-	-	No	-	No	No
23	-	No	No	-	-	No	-	No	No
24	-	No	No	-	-	No	-	No	No
25	-	No	29.95	-	-	28.99	-	No	30.02
26	-	No	No	-	-	No	-	No	No
27	-	No	No	-	No	No	-	No	No
28	-	No	No	-	No	No	-	No	No
29	-	No	No	-	No	No	-	No	No
30	-	No	No	-	No	No	-	No	No
31	-	No	No	-	No	No	-	No	No
32	-	No	No	-	No	No	-	No	No
33	-	No	No	-	No	No	-	No	No
34	-	No	No	-	No	No	-	No	No
35	-	No	No	-	No	No	-	No	No
36	-	No	No	-	No	No	-	No	No
37	-	No	No	-	No	No	-	No	No
38	-	No	No	-	No	No	-	No	No
39	-	No	No	-	No	No	-	No	No
40	-	No	No	-	No	No	-	No	No
41	-	No	No	-	No	No	-	No	No
42	-	No	No	-	No	No	-	No	No
43	-	No	-	-	No	-	-	No	-
44	-	No	-	-	No	-	-	No	-