

---

## LA MALALTIA DE L'ENROTLLAMENT DE LA FULLA DE VINYA I VIRUS ASSOCIATS

---

**Joan Sanxis i Sergi Maicas**

Departament de Microbiologia i Ecologia, Universitat de València

REBUT: 21 de maig de 2015 - ACCEPTAT: 22 de juny de 2015

### RESUM

L'enrotllament de la fulla de la vinya és una malaltia d'origen víric que té un gran impacte negatiu sobre els conreus i la producció de raïm de qualitat. Es coneix des de fa més d'un segle, amb una distribució mundial i amb deu espècies de closterovirus associades; el principal agent etiològic n'és el virus 3 associat a l'enrotllament de la fulla de la vinya (*grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3). L'estudi de la família *Closteroviridae* i la seua filogènia han permès comprendre l'evolució d'aquests virus, que experimenten una forta selecció negativa, amb molta migració, però algunes espècies han aconseguit augmentar la variabilitat genètica mitjançant processos de recombinació. Fins ara s'han descrit sis variants genètiques del GLRaV-3, però el nombre va augmentant. La transmissió d'aquests virus és semipersistent i la realitzen insectes vectors pertanyents a la superfamília *Coccoidea*. Són insectes partenogenètics, amb una nombrosa descendència que, durant el seu primer estat larvari, es pot dispersar pel vent, i, per tant, tenen una alta eficiència a l'hora d'infectar els conreus de vinya. Els danys ocasionats per aquesta malaltia als conreus de vinya poden ser molt variables, sobretot pèrdua de vigor dels ceps i minva de la productivitat. A llarg termini, s'observa que tenen un efecte acumulatiu, de manera que en disminueixen significativament el temps de vida productiva. En els últims anys s'han desenvolupat tècniques de detecció més ràpides i potents, com la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) amb transcriptasa inversa (RT-PCR) o la seqüenciació de nova generació, que permeten detectar les espècies i les seues variants alhora, i que proporcionen, a més, informació nova sobre l'epidemiologia de la malaltia. Les tècniques de

Correspondència: Sergi Maicas. Carrer del Doctor Moliner, 50. 46100 Burjassot (València). Tel.: 963 543 214. Fax: 963 544 570. A/e: [sergi.maicas@valencia.edu](mailto:sergi.maicas@valencia.edu).

detecció desenvolupades, utilitzades als vivers per testar el material vegetal que es comercialitza, resulten la pràctica més efectiva per al control de la propagació d'aquesta malaltia. En aquest treball presentem una revisió bibliogràfica que pretén mostrar la recerca feta fins avui dia sobre aquesta malaltia.

PARAULES CLAU: ampelovirus, *Closteroviridae*, *grapevine leafroll-associated virus-3*, *Coccoidea*, variants genètiques, virus de la vinya.

## **LA ENFERMEDAD DEL ENROLLAMIENTO DE LA VIÑA Y VIRUS ASOCIADOS**

### **RESUMEN**

El enrollamiento de la hoja de la vid es una enfermedad de origen vírico que tiene un gran impacto negativo sobre los cultivos y la producción de uva de calidad. Se conoce desde hace más de un siglo, con una distribución mundial y con diez especies de closterovirus asociadas a esta; el principal agente etiológico es el virus 3 asociado al enrollamiento de la hoja de la vid (*grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3). El estudio de la familia *Closteroviridae* y su filogenia han permitido comprender la evolución de estos virus, que experimentan una fuerte selección negativa, con mucha migración, pero algunas especies han logrado aumentar la variabilidad genética mediante procesos de recombinación. Hasta ahora se han descrito seis variantes genéticas del GLRaV-3, pero el número va aumentando. La transmisión de estos virus es semipersistente y la realizan insectos partenogenéticos, con una numerosa descendencia que durante su primer estado larvario se puede dispersar por el viento y, por tanto, poseen una alta eficiencia a la hora de infectar los cultivos de vid. Los daños ocasionados por esta enfermedad en los cultivos de vid pueden ser muy variables, sobre todo pérdida de vigor de las cepas y merma en la productividad. A largo plazo se observa que tienen un efecto acumulativo, por lo que disminuye significativamente el tiempo de vida productiva. En los últimos años, se han desarrollado técnicas de detección más rápidas y potentes, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa inversa (RT-PCR) o la secuenciación de nueva generación, que permiten detectar las especies y sus variantes al mismo tiempo y que proporcionan, además, nueva información sobre la epidemiología de la enfermedad. Las técnicas de detección desarrolladas, utilizadas en los viveros para testar el material vegetal que se comercializa, son la práctica más efectiva para el control de la propagación de esta enfermedad. En este trabajo presentamos una revisión bibliográfica que pretende mostrar la investigación realizada hasta día de hoy sobre esta enfermedad.

## La malaltia de l'enrotllament de la fulla de vinya i virus associats

PALABRAS CLAVE: ampelovirus, *Closteroviridae*, *grapevine leafroll-associated virus 3*, *Coccoidea*, variants genéticas, virus de la viña.

### GRAPEVINE LEAFROLL AND ASSOCIATED VIRUS

#### ABSTRACT

Grapevine leafroll is a viral disease that has a large negative impact on crops and on the production of quality grapes. Known for over a century, with a worldwide distribution and 10 species of closterovirus associated with it, its main etiological agent is *grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3). The study of the *Closteroviridae* family and its phylogeny allowed an understanding of the evolution of these viruses, which undergo a strong negative selection with much migration, although some species have managed to increase their genetic variability through recombination. Six genetic variants of GLRaV-3 have been described up to now, but the number is increasing. The transmission of these viruses is semipersistent and it is carried out by insect vectors belonging to the superfamily *Coccoidea*. These insects are parthenogenetic, producing a large number of offspring which during their first larval stage may be dispersed by the wind and therefore have a high efficiency in infecting vineyards. The damage caused by this disease in vineyards can be highly variable and especially includes loss of vigor of vines and loss of productivity. In the long term, it has been observed that it has a cumulative effect, significantly reducing the productive lifetime of vines. In recent years, faster and more powerful techniques have been developed for detection, such as reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and new-generation sequencing, allowing species and their variants to be detected while moreover providing new information on the epidemiology of the disease. Detection techniques developed in nurseries, which are used to test plant material that is sold, are the most effective practice to control the spread of this disease. In this paper, we present a literature review that aims to update the research carried out to date on this disease.

KEYWORDS: ampelovirus, *Closteroviridae*, grapevine leafroll-associated virus 3, *Coccoidea*, genetic variants, grapevine leafroll disease.

## 1. INTRODUCCIÓ

La malaltia de l'enrotllament de la fulla de la vinya (GLD, sigles de l'anglès *grapevine leafroll disease*) és una de les malalties víriques de la vinya

més importants i afecta conreus arreu del món. L'espècie *Vitis vinifera* L. és susceptible de ser infectada per un ampli ventall de malalties víriques: es coneixen al voltant de seixanta virus pertanyents a vint gèneres diferents que poden infectar la vinya. La més destructiva de totes és la GLD. S'estima que és causant del 60 % de les pèrdues ocasionades per malalties d'origen víric de la producció de raïm en tot el món (Naidu *et al.*, 2008), pèrdues econòmiques comparables a algunes malalties causades per fongs.

L'etiologia de la GLD es considera molt complexa. Es coneixen al voltant de deu virus associats a la malaltia de l'enrotllament (*grapevine leafroll-associated virus*, GLRaV). El GLRaV-3 es considera l'agent etiològic més important de la GLD. Entre els vectors dels virus s'inclouen les cotxinilles i els insectes d'escates blanques, *Pseudococcidae* i *Coccidae*, respectivament. Un virus com el GLRaV-3 es pot transmetre per molts insectes vectors, però també alguns vectors poden transmetre GLRaV diferents. També se sap que més d'un tipus de GLRaV pot infectar el mateix cep i originar-li efectes sinèrgics o antagonics. La metagenòmica és la millor eina que es pot utilitzar per a entendre cada volta millor la GLD, a més d'altres malalties víriques amb etiologies similars.

Com ocorre en alguns casos de malalties d'origen víric, també en la malaltia de l'enrotllament, la simptomatologia pot ser molt subtil o no haver-n'hi, i és en aquests casos que cal més prevenció i atenció per a detectar-la, ja que els ceps infectats actuen de reservoris invisibles del virus i n'augmenten el risc de propagació. La dispersió més gran que ha sofert aquesta malaltia ha sigut a través dels portaempelts. A pesar que la seqüenciació ja és una eina a l'abast de moltes empreses dedicades a la venda de ceps o portaempelts, encara no està totalment generalitzada. En els últims anys s'ha desenvolupat la seqüenciació de nova generació, que, a més d'oferir nombrosos avantatges en diferents camps de la biologia, aportarà més coneixements sobre els agents etiològics que ajudaran a controlar la GLD.

### **1.1. Repàs històric de la malaltia**

La malaltia de l'enrotllament de la fulla de la vinya s'originà al Vell Món i després s'estengué mundialment pel comerç de material de cultiu i de propagació. L'origen se situa a Europa, a la conca mediterrània i al Pròxim Orient. Hi ha algunes proves que confirmen aquesta hipòtesi:

a) En la bibliografia del principi del segle xx d'aquestes zones, s'hi descriu com a *enrogiment* una condició anormal de les vinyes de raïm rosat, que consisteix en un descoloriment de les fulles i un enrotllament d'aquestes cap al revers. Freqüentment, s'atribuïa aquesta condició a desordres fisi-

## La malaltia de l'enrotllament de la fulla de vinya i virus associats

ològics. En francès, li deien *rougeau*, *Rollkrankheit*, en alemany, i *rossore*, en italià.

b) La presència de brots de vinya secs, inclosos en un herbari del nord-est de Sicília entre 1880 i 1888, que presentaven distints graus de coloració en les fulles. Les fulles d'un espècimen eren negres i més estretes del que és normal, amb la superfície majoritàriament clivellada. L'espècimen que presentava aquestes característiques fou etiquetat en l'herbari com a «Malattie della vite. Rossore. Foglie quasi nere o rosso-nere. Vitigno nero. Settembre 1885-1886».

c) Es van trobar vinyes infectades per la GLD, entre 1889 i 1891, en un camp de vinya abandonat a Califòrnia, abans de la propagació de la fil·loxera (*Dactulosphaira vitifoliae*) al voltant de 1900.

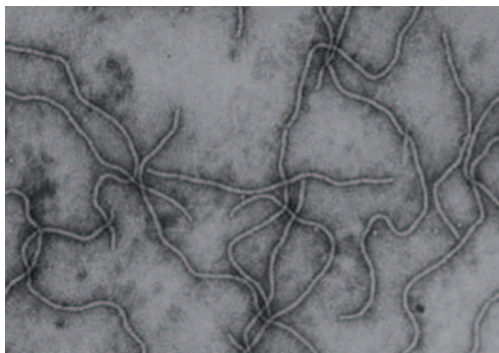
d) L'aparició d'alguns dels virus associats a l'enrotllament, GLRaV-1 i GLRaV-3, en algunes regions on s'ha cultivat vinya des de fa segles i on la fil·loxera no és present, per exemple: Xipre, el Iemen, parts de la Xina, Armènia i el sud de Turquia (Maree *et al.*, 2013).

Es desconeixia l'etiologia de la GLD fins que Namba *et al.* (1979) trobaren partícules semblants en closterovirus en seccions del floema i en les fulles de vinyes afectades per la GLD. Es va suggerir que aquests tipus de virus podien ser l'agent infecció de la GLD, i pocs anys més tard es va confirmar mitjançant estudis de la ultraestructura de teixits de les fulles de vinyes amb GLD. Gugerli (2009) identificà dos virus semblants a closterovirus, però serològicament distints, que tenien una longitud de 2.200 i 1.800 nm i van ser identificats a partir de preparacions purificades de fulles d'una vinya amb GLD. Aquests dos virus els anomenaren *grapevine leafroll-associated viruses 1 i 2* ('virus associats a l'enrotllament de la fulla de la vinya') (GLRaV-1 i GLRaV-2). Després, l'equip de Gugerli n'hi va afegir un tercer, que, a més a més, provenen que es podia transmetre per una cotxinilla cotonosa com a vectora. Amb la millora de les tecnologies d'anàlisi molecular, especialment la seqüenciació, s'augmentà el nombre de closterovirus associats amb la GLD, fonamentalment el GLRaV-3 (figura 1). Aquesta numeració dels virus és la que s'utilitza actualment (Martelli *et al.*, 2012).

### 1.2. Simptomatologia

Els símptomes de la GLD poden variar molt segons l'estació o les condicions climàtiques. A més a més, algunes varietats de ceps són totalment asimptomàtiques i poden servir com a reservori dels virus. A la primavera, tant el naixement dels brots nous com el seu desenvolupament es poden retardar, normalment, unes poques setmanes. Els primers símptomes a les fulles comencen a la primera meitat de l'estiu, però poden aparèixer abans en vinyes que hagen sofert estrès hídric. Aquests primers símptomes aug-

**FIGURA 1.** *Micrografia electrònica de partícules purificades del virus GLRaV-3*



Font: H. J. Maree.

menten cap al final de l'estiu. En la majoria de vinyes de raïm fosc (cabernet sauvignon, cabernet franc, merlot, mission i pinot noir s'utilitzen com a indicadors biològics), la GLD causa enrogiment del limbe de les fulles, alhora que la nervadura primària i secundària roman verda (figura 2).

Algunes d'aquestes vinyes desenvolupen un color roig uniforme en tota la fulla, sense nervis verds. A les vinyes de raïm clar, la zona del limbe de la fulla es pot tornar cloròtica, encara que de vegades siga un símptoma molt subtil. A mesura que avança l'estació de creixement, van augmentant el nombre de fulles que mostren símptomes, els quals progressen des de la base de les branques fins a la punta. Cap al final de l'estiu les fulles s'enrotllen cap al revers, però, a pesar de ser la característica que dona nom a la malaltia, es tracta d'un símptoma que pot variar molt, depenent de la varietat del cultiu; per exemple, el cultiu de chardonnay mostra un enrotllament molt pronunciat, però el cultiu de Thompson sense llavor i el de sauvignon blanc mostren poc enrotllament o no en mostren en les fulles. En aquests últims cultius és pràcticament impossible detectar la infecció visualment, excepte una lleu pèrdua de vigor als ceps. Per això, aquesta malaltia es pot propagar fàcilment si s'utilitzen esqueixos sense testar (Martelli *et al.*, 2012).

La coloració dels fruits rogencs de la vinya es deu a l'acumulació de pigments antociànics, predominantment a la pell del raïm, que produeixen una gamma de colors des del roig fins al blau fosc i es desenvolupen a partir del començament del verol, gràcies a l'activació dels gens de la via biosintètica dels flavonoides (Boss *et al.*, 1996; Gutha *et al.*, 2010). Sota condicions normals, els ceps no mostren canvis en la coloració de les fulles durant l'època de creixement. Només ocorre en les fulles infectades per virus de la GLD (i no per a tots els virus que la provoquen, sobretot el GLRaV-3).

## La malaltia de l'enrotllament de la fulla de vinya i virus associats

**FIGURA 2.** Fulles de la varietat pinot noir infectades amb GLRaV-1 i GLRaV-9, amb els símptomes d'enrogiment del limbe (àrea fosca) i la venaçió verda (més clara) que l'emmarca típics de la GLD



Font: F. Constable.

Gutha *et al.* (2010) van establir la hipòtesi que l'expressió de gens de la ruta biosintètica dels flavonoides era activada a les fulles infectades pels virus causants de la GLD, que produïen així els símptomes clàssics. Una explicació que els símptomes siguin més pronunciats a partir del verol pot ser a causa de canvis en el metabolisme de la planta hoste, i que s'altere el transport del floema (els GLRaV es localitzen als teixits floemàtics). Els seus resultats mostren un nivell molt elevat de flavonols a les fulles infectades, comparant-les amb fulles lliures d'infeccions virals, i els flavonols sintetitzats *de novo* predominants eren la quercetina i la miricetina. En aquestes fulles infectades també es troben grans quantitats de proantocianidines (tanins). És possible que aquests compostos flavonoides conferisquen protecció enfront de l'estrès oxidatiu i/o contra l'atac de patògens oportunistes, a causa del seu poder antioxidant (Treutter, 2006; Korkina, 2007; Hernández *et al.*, 2009; Gutha *et al.*, 2010). També s'ha comprovat que el contingut total de clorofil·les i de carotenoides de les fulles infectades és un 20 % més baix que en fulles lliures de virus.

### 1.3. Citopatologia

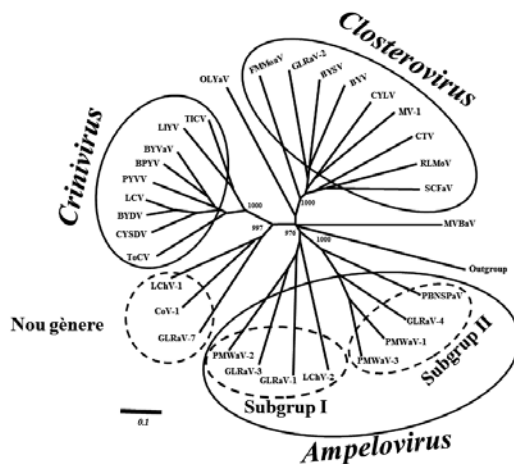
La característica citopatològica principal de la infecció de tots els GLRaV és la presència d'inclusions intracel·lulars en els teixits floemàtics, formats per agregats de partícules virals mesclades amb vesícules membranoses que contenen filaments molt fins (RNA viral). Les vesícules membranoses poden derivar de la vesiculació perifèrica de mitocondris i una desorganització dels orgànuls (una varietat del GLRaV-4, del GLRaV-1 i del GLRaV-3), o bé de la vesiculació del reticle endoplasmàtic (GLRaV-2 i GLRaV-7) (Martelli, 2014).

### 1.4. Virus associats a l'enrotllament de la fulla de la vinya

Avui dia els virus associats a la malaltia de l'enrotllament s'atribueixen tots a la família *Closteroviridae*. Es coneixen com a *grapevine leafroll-associated viruses* (GLRaV) de l'1 al 9 i quatre més recentment descrits, GLRaV-11, GLRaV-Car, GLRaV-De i GLRaV-Pr. Menys el GLRaV-2, el GLRaV-7 i el GLRaV-8, tots els altres pertanyen al gènere *Ampelovirus*. El GLRaV-2 s'inclou en el gènere *Closterovirus*, el GLRaV-7 encara no pertany a cap dels gèneres —s'ha proposat un gènere nou, *Velarivirus*, però no és acceptat encara (Maree *et al.*, 2013)— i el GLRaV-8 no és d'origen viral, la seua seqüència s'assembla a seqüències de RNA de *V. vinifera*; per tant, ja no es reconeixerà com a virus (Martelli *et al.*, 2012). Les anàlisis moleculars dels GLRaV del gènere *Ampelovirus* suggereixen que podria haver-n'hi dos grups. En el subgrup I se situarien el GLRaV-1 i el GLRaV-3, i en el subgrup II, el GLRaV-4. Les dades serològiques i moleculars han aportat informació necessària per a estudiar l'estreta relació que hi ha entre els GLRaV-4, -5, -6, -9, -Pr, -De i -Car i avaluar la possibilitat de considerar-los tots varietats del GLRaV-4 (figura 3) (Martelli *et al.*, 2012).

S'aprecien diferències en la simptomatologia dels diferents virus; per exemple, el GLRaV-1, -3 i la majoria de varietats de GLRaV-2 normalment indueixen símptomes pronunciats a les fulles de les vinyes. Però el GLRaV-7 produeix símptomes suaus o ni tan sols en produeix (Maree *et al.*, 2013).

**FIGURA 3.** *Arbre filogenètic construït amb les seqüències completes dels aminoàcids del gen HSP70h dels membres de la família Closteroviridae*



FONT: Modificada a partir de Martelli *et al.* (2012).



### 1.5. Família *Closteroviridae*

La família *Closteroviridae* i els seus virus es caracteritzen per la seua longitud, fins a 2.000 nm, perquè són flexibles, sense embolcall, polars, virions amb dues proteïnes de la càpsida: la proteïna major (CP) cobreix la majoria del genoma format per RNA, i la menor (CPm) es troba en un dels extrems del virió. Els virus d'aquesta família tenen els genomes més llargs de tots els virus amb RNA monocatenari positiu que afecten les plantes (fins a 20 kb). A pesar de les diferències en la posició dels marcs oberts de lectura (*open reading frame*, ORF) entre les espècies de virus, els genomes tenen una organització comuna. Els ORF 1a i 1b codifiquen proteïnes relacionades amb la replicació, i amb dominis conservats de la proteasa metiltransferasa, helicasa i RNA polimerasa dependent de RNA (RdRp) (Dolja *et al.*, 2006). En els ORF següents està codificada una petita proteïna hidrofòbica amb afinitat per les membranes, que és una proteïna homòloga a les proteïnes de les plantes de xoc tèrmic HSP70 (HSP70h). Les funcions hipotètiques per a aquesta proteïna s'associen a: *a*) moviment d'una cèl·lula a una altra cèl·lula, *b*) muntatge de complexos amb moltes subunitats per a la replicació del genoma, *c*) síntesi de RNA subgenòmic i *d*) muntatge de les partícules del virus (Jarugula *et al.*, 2010; Satyanarayana *et al.*, 2004).

Actualment hi ha tres gèneres en la família *Closteroviridae*: *Ampelovirus*, *Crinivirus* i *Closterovirus* (*Velarivirus* s'ha proposat recentment) (Martelli *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2013).

*a*) *Ampelovirus*: el vector principal de transmissió són les cotxinilles, tenen el genoma monopartit, s'hi inclouen virus com, per exemple, alguns GLRaV o el virus del marcement de la pinya transmès per cotxinilles (PMWaV-1).

*b*) *Crinivirus*: són transmesos per les mosques blanques, tenen genoma bipartit o tripartit; per exemple, el virus de la clorosi de la tomata (ToCV), el virus infecció de la clorosi de la tomata (TICV) o el virus de les venes grogues de la creïlla (patata) (PYVV).

*c*) *Closterovirus*: els principals vectors són els àfids, tenen genoma monopartit i un parell d'exemples en són el GLRaV-2 i el virus de la tristesa dels cítrics (CTV).

Els virus de la família *Closteroviridae* són transmesos per insectes vectors, els quals afavoreixen infeccions amb diferents virus. Aquestes infeccions amb més d'un tipus de virus tenen efectes importants en l'evolució d'aquests virus. Pot tenir incidència dins d'una població de variants d'un sol virus i també permetre la recombinació entre diferents virus, l'adaptabilitat i la patogenicitat dels quals pot afectar. La interacció entre el virus i el seu vector, i la coinfecció d'un mateix hoste, pot tenir efectes sinèrgics o antagònics. Un efecte sinèrgic pot provocar un augment de la gravetat dels símpto-

mes per l'acumulació d'un dels virus, o dels dos que coinfecten, comparant-ho amb els efectes d'una sola infecció. L'explicació d'aquest fenomen sembla que és que un dels virus suprimeix els mecanismes de defensa de l'hoste i afavoreix així l'acumulació (Palukaitis, 2011). Alguns crinivirus produeixen un augment de l'expressió de símptomes a causa d'un efecte sinèrgic entre diferents crinivirus. L'efecte antagònic entre variants properes del mateix virus és la base de la protecció encreuada que s'utilitza en agricultura; per exemple, per a controlar el dany ocasionat per les varietats més greus del CTV (Moreno *et al.*, 2008).

El fenomen de la recombinació entre genotips divergents s'ha descrit en els gèneres *Closterovirus* i *Ampelovirus*, i s'ha vist que ha tingut un paper molt important en l'evolució d'aquests gèneres augmentant-ne la diversitat genètica i l'adaptabilitat (Turturo *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2013).

### **1.6. El virus 3 associat a l'enrotllament de la fulla de la vinya (GRLaV-3)**

El GRLaV-3 és l'espècie tipus del gènere *Ampelovirus*, família *Closteroviridae* i membre del subgrup I junt amb el GLRaV-1. Les partícules virals són filaments flexibles, amb unes dimensions de 1.800 × 12 nm, i tenen una estructura helicoidal amb deu subunitats proteiques per gir de l'hèlix (3,5 nm per gir). El genoma del virus és de RNA monocatenari de sentit positiu, i constitueix prop del 5 % del pes de cadascuna de les partícules. La proteïna major de la càpsida (CP), de 34 kDa, cobreix tota la longitud dels virions, excepte l'extrem 5' (d'uns 100 nm). Les proteïnes que se suposa que estan implicades en l'encapsidació d'aquesta estructura són proteïnes possiblement també implicades en el transport sistèmic cèl·lula a cèl·lula del virus (Dolja *et al.*, 2006).

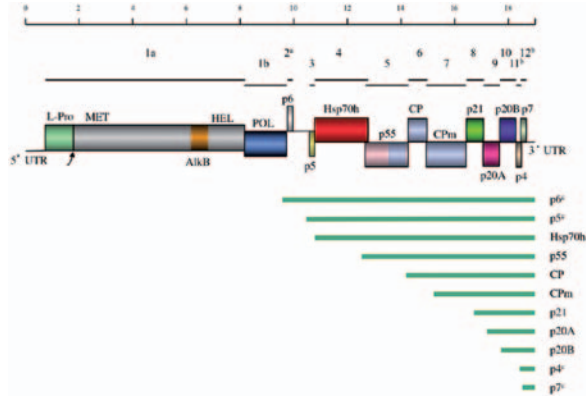
### **1.7. Genoma de GLRaV-3 i funció de les proteïnes codificades**

Actualment només es coneix el genoma complet de deu aïllats del virus GLRaV-3, i s'ha vist que hi ha quatre grups principals de variants genètiques (es pensa que n'hi ha més de sis, però encara no s'han seqüenciat els aïllats dels grups IV i V, només els I, II, III i VI). Tots tenen una regió 5'UTR molt llarga, d'uns 510-802 nucleòtids (nt), i una 3'UTR, més curta i més conservada. L'organització del genoma dels grups I, II i III comprèn tretze marcs oberts de lectura (ORF), anomenats 1a, 1b i 2 fins a 12 segons la convenció proposada per Agranovsky *et al.* (1994) (figura 4).

Entre els ORF 2 i 3 hi ha una regió intergènica rica en la parella de nucleòtids guanina-citocina (GC) que és atípica dels altres membres de la família

## La malaltia de l'enrotllament de la fulla de vinya i virus associats

**FIGURA 4.** Diagrama esquemàtic del genoma del GLRaV-3. Les línies sobre el mapa genòmic indiquen les posicions dels ORF i els seus nombres. En el mapa genòmic, les caixes indiquen la posició dels gens i els seus productes. A sota es representen amb línies els RNA subgenòmics (sgRNA)



FONT: Maree *et al.* (2013), amb modificacions.

*Closteroviridae*. Els genomes dels aïllats pertanyents al grup VI es caracteritzen per l'absència de l'ORF 2 (Bester, 2012; Seah *et al.*, 2012).

Les funcions de les proteïnes codificades pel genoma del GLRaV-3 s'estudien per comparació amb els ORF homòlegs d'altres virus d'una cadena de sentit positiu de RNA. Aquests virus tenen un nucli molt ben conservat de gens implicats en la replicació, i una altra regió més variable que codifica les proteïnes estructurals i accessòries. Els ORF 1a i 1b del GLRaV-3 són els més ben conservats i codifiquen una metiltransferasa, RNA helicasa i dominis de l'RNA polimerasa dependent de RNA (Ling *et al.*, 2004). A més a més, l'ORF 1a conté una proteasa líder tipus papaïna (L-Pro), implicada en l'acumulació de RNA, la capacitat d'invasió del virus i de la propagació sistèmica en la planta hostatjadora. També aquest ORF 1a codifica un domini AlkB, capaç de desmetilar l'RNA, el qual es troba present en molts virus de RNA que infecten plantes llenyoses. S'ha proposat que tindria una funció de reparació de l'RNA viral (Born *et al.*, 2008).

L'ORF 2 codifica una proteïna petita de la qual no hi ha homòlegs per a inferir-ne la funció. A més, no totes les variants del virus en tenen; per això, sembla no exercir cap funció imprescindible per al virus. Ben al contrari, els següents cinc ORF del 3-7 formen un mòdul de cinc gens molt ben conservats, que de fet són la principal característica dels virus de la família *Closteroviridae* (Dolja *et al.*, 2006). L'ORF 3 codifica una proteïna transmembrana, anàloga a la del BYV, que té com a funció el moviment d'una cèl·lula a una altra. L'ORF 4 codifica una xaperona homòloga a l'HSP70 (HSP70h) amb la mateixa funció que la proteïna anterior i, a més, participa en l'acoblament

de la cua dels virions típica de closterovirus (Peremyslov *et al.*, 2004). La funció de la proteïna codificada per l'ORF 5, d'uns 60 kDa aproximadament, és similar a l'HSP70h. La proteïna major de la càpsida (CP) que forma tot el llarg del cos del virió, la codifica l'ORF 6. I la proteïna menor de la càpsida (CPm), que és el component més important de la cua dels virions, la codifica l'ORF 7, l'últim del grup de gens conservats. Una característica que cal destacar és que l'ordre dels ORF que codifiquen la CP i la CPm en el GLRaV-3 és el mateix que el dels crinivirus bipartits, i invers al del gènere *Closterovirus*.

Malgrat que aquestes proteïnes no hagen sigut caracteritzades completament per al GLRaV-3, és clar que les funcions d'acoblament de la cua del virió i el moviment cèl·lula a cèl·lula que exerceixen l'HSP70h, la CPm i la proteïna de 60 kDa són genèticament inseparables dels closterovirus. Es pot considerar l'acoblament de la cua una estructura per al moviment dels virions específica dels closterovirus (Dolja, 2003; Peremyslov *et al.*, 2004). Encara que els ORF 8-12 només es troben en el gènere *Ampelovirus*, se'n pot esbrinar la funció per analogia amb altres membres de la família *Closteroviridae*. Els ORF 8, 9 i 10 codifiquen proteïnes implicades en la supressió dels RNA d'interferència de l'hoste (es consideren determinants de patogenicitat viral) i en el transport viral a llarga distància (Maree *et al.*, 2013). Els ORF 11 i 12 són prou menuts i únics del virus GLRaV-3. Sembla que no tenen cap funció important que s'haja de conservar, ja que aquests ORF són molt diversos entre les distintes variants genètiques del mateix virus GLRaV-3. Un dels reptes que afrontaran els investigadors en els pròxims anys serà determinar les funcions dels ORF 8-12 i del domini AlkB. Per això el nou desenvolupament dels clons de DNA complementari, biològicament actius, serà de gran ajuda per a aquesta tasca (Jarugula *et al.*, 2012).

## **1.8. Variants genètiques del GLRaV-3**

Durant els últims anys de recerca, alhora que han millorat les tècniques d'anàlisi genètiques, s'han descobert més virus i també més variants. El cas més estudiat dels virus causants de la GLD és el GLRaV-3. Durant els primers anys de recerca es van fer estudis de seqüenciació combinats amb *single-stranded conformation polymorphism* (SSCP) per comparar la variabilitat genètica de les regions genòmiques codificadores de RdRp (RNA polimerasa dependent de RNA), HSP70h i de les CP (Turturo *et al.*, 2005). A partir d'aquest estudi es concloué que n'hi havia almenys dues variants, grups I i II, entre els aïllats analitzats (Jooste i Goszczynski, 2005).

Fins ara es poden considerar, segons els estudis que han analitzat filogenèticament l'HSp70h i la CP, sis grups de variants del GLRaV-3, i uns altres més que no es poden confirmar com a tals fins que no es duguen a terme

## La malaltia de l'enrotllament de la fulla de vinya i virus associats

més anàlisis genètiques. Se n'identifiquen dos grups principals segons la filogènia; un, que inclou els grups de variants I-V, i un altre, amb el grup VI i aquelles variants semblants al VI (fins ara anomenats *VI-like*). La comparació dels genomes complets d'aïllats de diferents variants ha permès observar que hi ha determinades zones on la variació nucleotídica és més gran; la més destacable és la variabilitat de longitud de la zona 5'UTR. També cal tenir en compte el risc a l'hora d'interpretar els articles de filogenètica que hagen utilitzat només seqüències parcials dels genomes (Maree *et al.*, 2013).

La distribució dels virus variants del GLRaV-3 depèn de molts factors, com les interaccions específiques entre vector i virus, la direcció del vent predominant, la combinació de variants del GLRaV-3, l'ús de material vegetal infectat i les pràctiques de cultiu de la vinya. Geogràficament, la distribució de les variants del GLRaV-3 no és homogènia. Segons alguns sondejos, s'ha vist que a Sud-àfrica, per exemple, predominen les variants del grup II del GLRaV-3; en algunes regions de la Xina predomina el grup I; a Portugal, els grups I i II, i a Nova Zelanda, els grups I, VI i les variants semblants al grup VI (Maree *et al.*, 2013). L'estudi de Sharma *et al.* (2011) a la vall de Napa (Califòrnia) mostrava que en un 21 % de les mostres infectades hi havia una barreja de grups de variants genètiques del virus i que en aquestes barreges hi havia certa predisposició. La transmissió de les variants del grup VI era més freqüent a soles, seguida d'infeccions combinades amb altres grups, i la combinació menys freqüent era amb els virus del grup I. Aquesta fou la primera prova que les variants del GLRaV-3 són biològicament distintes.

En els estudis de variabilitat genòmica dels aïllats del GLRaV-3 de Hall (1999) i Lole *et al.* (1999) s'utilitzaren gràfiques de similitud en què es compararen seqüències dels genomes sencers de diferents grups de variants (I, II, III i VI). Els grups IV i V no s'utilitzaren perquè encara no se'n coneixien les seqüències genòmiques senceres (dades no mostrades). Aquests estudis permeten veure les regions genòmiques amb més variabilitat: la 5'UTR, els ORF 2, 11 i 12, i la 3'UTR. En la regió 5'UTR hi ha variació en la seua longitud; per exemple, per als grups I i II conté 737 nucleòtids, però en el III és 65 nucleòtids més curta (672 nt) (Jooste *et al.*, 2010). És important conèixer el genoma dels grups IV i V per a determinar si hi ha seqüències conservades dins d'aquesta regió.

Les variants del grup VI no tenen ORF 2 i la seua funció en els altres grups és desconeguda. L'ORF 11 té la mateixa grandària i posició per a tots els grups analitzats. Però les variants del grup IV necessiten un codó d'inici alternatiu (ACG) (Wang *et al.*, 2011). A més a més, els aïllats del grup VI tenen canvis del marc de lectura que fan que es modifiqui la seqüència d'aminoàcids a partir del cinquè aminoàcid traduït. I les variants semblants al del grup VI, encara que tenen el mateix marc de lectura, canvien la traducció, que comença 3 nucleòtids (nt) abans (1 nt superposat a l'ORF 10) i acaba 15 nt més tard (14 nt superposats a l'ORF 12) dels suposats lloc d'inici i ter-

minació de les altres variants del GLRaV-3 (Chooi *et al.*, 2013). El lloc d'inici de l'ORF 12 és comú per a tots els grups, però en el grup VI ocorre un canvi en la pauta de lectura, el qual és reconegut per un codó de terminació prematur i, per tant, hi ha una reducció de grandària dels polipèptids produïts (de 18 a 12 nt més curt). A l'ORF 11 hi ha molta variabilitat en la seqüència d'aminoàcids dels polipèptids entre els distints grups de variants. Per això es pensa que aquest ORF està sotmès a evolució neutral, i no resulta essencial per a la capacitat infectiva del virus. Es necessiten més estudis sobre els ORF 2, 11 i 12 per a entendre la seua funció, i el paper que exerceixen en la biologia del GLRaV-3. La regió 3'UTR varia en longitud entre els diferents grups filogenètics. La mitjana d'identitat nucleotídica total d'aquesta regió entre tots els aïllats dels grups I-III, VI, i semblants al VI és de 88,7 % (una dada semblant s'ha obtingut amb l'anàlisi dels crinivirus BYV) (Agranovsky *et al.*, 1994). Les diferències en la seqüència de la regió 3'UTR no es troben distribuïdes de manera uniforme. La zona de més variació és la 5' de la 3'UTR (la regió més propera a l'ORF 12). En aquesta regió la identitat entre els distints grups decreix fins al 50 %. No obstant això, hi ha dues regions d'uns 60 nt que tenen una variació molt baixa (identitat entre els grups a prop del 90 %). Aquestes àrees molt conservades poden representar elements *cis-acting* que són importants per a la replicació del GLRaV-3 (Jarugula *et al.*, 2010).

## **1.9. Plantes hostatjadores**

Els ampelovirus poden parasitar una àmplia gamma de tàxons vegetals, però els GLRaV sembla que es troben limitats a la vinya. Pel que es coneix, els GLRaV només s'han aïllat d'espècies pertanyents al gènere *Vitis*, sobretot *V. vinifera* i les seues varietats cultivades. Segurament a causa de la importància comercial d'aquest cultiu, els estudis han sigut limitats. Un estudi recent fet a la vall de Napa, Califòrnia, va mostrar que les espècies silvestres de *Vitis* (*Vitis californica* i els híbrids de *V. californica* × *V. vinifera*) poden ser infectades pel GLRaV-2 i GLRaV-3 (Klaassen *et al.*, 2011). També s'hi inclou l'espècie *Vitis labruscana* (Bahder *et al.*, 2013). És possible observar diferències en la gravetat dels símptomes entre diferents varietats de vinyes, les quals poden ser més o menys sensibles a la infecció del GLRaV. Les varietats de *V. vinifera* i els seus clons solen ser més susceptibles d'infecció que les altres espècies de *Vitis* i els híbrids, incloent-hi els portaempelts que poden no mostrar símptomes. Les diferències en la gravetat dels símptomes poden estar associades a les espècies del GLRaV i al tipus de variant dins de cada espècie. També la temperatura pot afectar l'expressió de la malaltia de l'enrotllament de la fulla. A més, els símptomes poden tardar a aparèixer fins a dotze mesos des del moment de la infecció d'un GLRaV (Constable i Rodoni, 2011).

## La malaltia de l'enrotllament de la fulla de vinya i virus associats

Com s'ha dit, el comerç de material vegetal infectat ha sigut la causa de l'expansió mundial d'aquesta malaltia i els seus agents etiològics. Només alguns països tenen programes nacionals de quarantena del material vegetal importat, per a tractar d'assegurar que el material arribi a l'agricultor lliure d'infeccions. Però resulta molt difícil que funcionen, bé perquè no poden ser aplicats amb rigor, o bé perquè és un control d'unes dimensions desproporcionades per als mitjans de què es disposa.

### 1.10. Insectes vectors

La transmissió d'aquests virus és possible gràcies a insectes hemípters que fan la funció de vectors. Per la incidència de la malaltia i el seu impacte en els cultius, aquests vectors són considerats una plaga. Les principals famílies a les quals pertanyen són *Pseudococcidae* i *Coccidae* (superfamília *Coccoidea*). La primera demostració de la transmissió de patògens de la GLD d'una planta a una altra fou en 1990 per Engelbrecht i Kasdorf. Demonstraren que la cotxinilla *Planococcus ficus* (Signoret) podia transmetre el GLRaV-3. Des d'aleshores, moltes cotxinilles (pseudocòccids) s'han confirmat com a vectors de GLRaV: *Pseudococcus maritimus* (Ehrhorn), *Pseudococcus viburni* (Signoret), *Pseudococcus longispinus* (Targioni-Tozzetti), *Pseudococcus calceolariae* (Maskell), *Pseudococcus comstocki* (Kuwana), *Planococcus citri* (Risso), *Phenacoccus aceris* (Signoret), *Heliococcus bohemius* (Sulc). A més a més dels vectors «d'escates blanques» (còccids, anomenats així per la coberta cerosa que els dona aspecte escatós): *Pulvinaria vitis* (L.), *Parthenolecanium corni* (Bouché), *Ceroplastes rusci* (L.), *Neopulvinaria innumerabilis* (Rathvon), *Coccus longulus* (Douglas), *Parasaissetia nigra* (Nietner) i les espècies de *Saissetia*. El ventall impressionant d'insectes vectors essencialment inclou totes les cotxinilles i tots els insectes «d'escates blanques» comuns a totes les parts del món on es troba la GLD (Almeida *et al.*, 2013).

La rellevància ecològica de cada insecte en la propagació de la GLD no es coneix amb precisió. No s'han trobat proves de cap especificitat entre virus i vectors per a la transmissió; fins ara sembla que tots els GLRaV poden ser transmesos per les diferents espècies de cotxinilles associades a la vinya que s'han testat (Tsai *et al.*, 2010), a pesar que a *Pl. ficus* i *Ps. calceolariae*, se'ls ha prestat més atenció en investigació. Un exemple que confirma aquesta hipòtesi és que *Pb. aceris* pot transmetre sis ampelovirus diferents (Le Maguet *et al.*, 2012). Tots els pseudocòccids associats a la vinya s'han de considerar possibles transmissors dels virus fins que no es demostre el contrari. Per això és molt important conèixer la biologia dels vectors.

Les cotxinilles de la vinya solen tenir quatre estadis larvaris en el cas de les femelles, i cinc en el cas dels mascles. La majoria de les espècies es reproduïxen per partenogènesi i produeixen una descendència molt nom-

brosa. Les larves del primer estadi són les que es poden dispersar més fàcilment. Poden ser transportades pel vent, així que poden introduir-se sense problemes als vivers i infectar els plançons en estoc. També aquestes larves dels primers estadis són les més eficients en la transmissió dels virus, encara que els insectes de tots els estadis són capaços de transmetre'n (Tsai *et al.*, 2008). Per tant, els insectes vectors que tenen més generacions anuals representen una amenaça més gran per a la propagació de la GLD. Aquests insectes s'alimenten del floema gràcies a l'aparell picador-xuclador, també anomenat *estilet*. La majoria poden alimentar-se del tronc, de les branques, de les fulles i dels fruits, però hi ha variacions en la localització en la mateixa vinya dependent de l'estació. A més a més, algunes espècies, com *Ps. calceolariae* o *Pl. ficus*, poden mantenir part de la població a les arrels dels ceps (Bell *et al.*, 2009). Aquest fet planteja un problema, per exemple, a l'hora de replantar un camp on puguen haver quedat arrels amb GLRaV i cotxinilles, perquè poden transmetre la malaltia als nous ceps que es planten (Pieteresen, 2006).

### **1.11. Transmissió dels virus**

Per a entendre com es propaguen les malalties d'origen víric cal esbrinar la manera de transmetre's que tenen. En els cas dels patògens transmesos per còccids i pseudocòccids, se sap poc de la seua transmissió i dels paràmetres que hi influeixen (Tsai *et al.*, 2010). Conèixer aquests paràmetres ens ajudarà a entendre millor l'epidemiologia de les malalties.

Els virus GLRaV són un cas complex d'estudiar, ja que hi ha molts virus i moltes variants genètiques que poden conviure junts, molts es poden transmetre per una sola espècie d'insecte i un mateix insecte pot transmetre molts virus (Tsai *et al.*, 2010) (figura 5). També les interaccions moleculars entre el virus i el vector poden afectar l'eficiència de la transmissió, igual que la grandària de les poblacions de cada virus afecta la probabilitat i l'eficiència de la transmissió (Almeida *et al.*, 2013). Les poblacions del GLRaV-3 varien estacionalment en grandària i en la seua distribució dins de la planta hoste, però no se sap ben bé per què ocorre això ni si hi influeix.

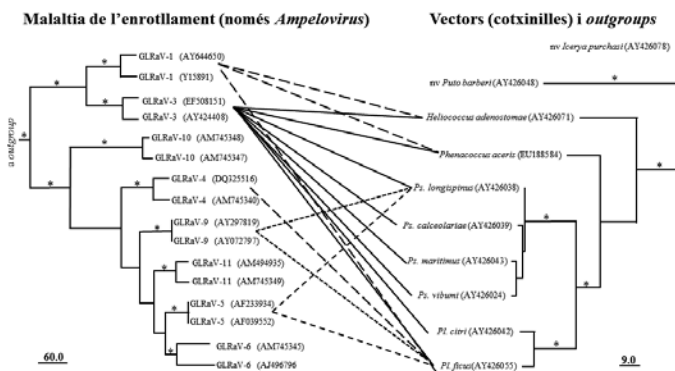
La població del virus augmenta a les fulles durant l'estació de creixement de la planta abans que les fulles caiguen per senescència. Sembla que augmenta l'adquisició dels virus i l'eficiència de la transmissió si les cotxinilles s'alimenten de les fulles, en comptes de fer-ho a les tiges (Tsai *et al.*, 2010). Encara que no s'hagen trobat gaires proves de canvis en la transmissió pel tipus de teixit de la planta o per l'estació, cal no ignorar la possibilitat que hi pugua haver una certa influència d'aquests factors (Almeida *et al.*, 2013).

Tsai *et al.* (2008) van mostrar proves que la transmissió dels GLRaV és semipersistent. L'eficiència de transmissió del GLRaV-3 per les larves del



## La malaltia de l'enrotllament de la fulla de vinya i virus associats

**FIGURA 5.** *Arbre de màxima parsimònia dels virus GLRaV i les cotxinilles vectors d'aquests virus. Els asteriscos indiquen les branques de l'arbre que estan suportades per un grau de dissimilitud > 70 % (suficient per a poder establir diferències entre espècies). Les línies relacionen els virus amb els seus vectors*



Font: Tsai *et al.* (2010), amb modificacions.

primer estadi de *Pl. ficus* és la més alta en les primeres 24 hores des de l'adquisició del virus, i s'estabilitza a les 48 hores. Les cotxinilles de *Pl. ficus* perden la capacitat de transmetre el GLRaV-3 quatre dies després de l'adquisició. Amb alguns estudis filogenètics posteriors es pensa que tots els GLRaV del gènere *Ampelovirus* es transmeten d'una manera semipersistent (Tsai *et al.*, 2010). Es pot pensar que aquesta característica impedeix una propagació ràpida del virus, però si es té en compte que els primers estadis larvaris dels vectors es poden disseminar pel vent, i que aquests vectors tenen un gran nombre de descendència i diverses generacions per temporada, la conclusió resulta la contrària. No obstant això, les conclusions que s'han obtingut es basen en un nombre d'estudis limitat, i és necessari continuar investigant la transmissió dels GLRaV per tal d'augmentar-ne el coneixement i desenvolupar millors estratègies i més completes per al control de la malaltia de l'enrotllament de la fulla de la vinya.

### 1.12. Ecologia i impacte de la GLD

La primera prova de la propagació de la GLD va sorgir a Sud-àfrica, a mitjan dècada dels vuitanta, on es va demostrar per estudis en què es plantaven ceps sans entre ceps infectats (Engelbrecht i Kasdorf, 1985). En la dècada dels noranta es continuaren duent a terme aquest tipus d'estudis que confirmaven el mateix i en tots es va fer notar la presència de les cotxinilles

als camps d'estudi. La taxa de propagació de les infeccions de GLD era similar en els estudis elaborats: un augment al voltant del 10 % per any en aquells camps on s'havia identificat la malaltia adés. No obstant això, hi ha regions, com Itàlia, que presenten una prevalença més baixa de l'esperada (20 % després de deu anys des de l'aparició) (Almeida *et al.*, 2013).

Com més gran és l'edat dels ceps, més exposició als insectes vectors i més probabilitats d'acollir una població més gran de virus. Les anàlisis espacials indiquen que les vinyes infectades es distribueixen aleatòriament a través dels blocs de ceps en els primers anys d'infecció, però que amb el temps la distribució acaba sent agregada. Això ho explica el fet que les primeres larves de pseudocòccids es poden dispersar pel vent, i en els penúltims estadis larvaris, s'encarreguen de la transmissió vinya per vinya dels virus. Els GLRaV i les seues variants poden interactuar entre ells o altres virus i tenir efectes distints durant la transmissió i l'establiment als hostes (Jooste *et al.*, 2011).

Alguns virus de plantes poden ser beneficiosos per a aquestes (Roossinck, 2011), però determinades condicions ambientals poden alterar els efectes que tenen aquests virus en els seus hostes. Les variacions dels efectes de la GLD degudes a canvis ambientals encara són molt desconegudes; per això cal estudiar amb més profunditat quines pràctiques de cultiu de la vinya poden reduir l'impacte d'aquesta malaltia als camps. Per exemple, la defoliació parcial de les vinyes infectades amb GLRaV-3 en millora la maduració i s'ha vist que augmenta la qualitat del most extret del raïm (Pereira-Crespo *et al.*, 2012).

Com s'ha vist en el punt anterior, alguns GLRaV com el GLRaV-3 són «vectors generalistes» i l'adaptació d'aquests a un vector nou, siga present o s'haja introduït novament en una àrea, pot desencadenar canvis dramàtics en la prevalença d'aquests virus (Almeida *et al.*, 2013). Si, a més, aquest vector nou té una eficiència més gran de transmissió d'un virus o una variant genètica, pot produir canvis en la prevalença relativa dels virus de la regió. Els coneixements de què disposem ara per ara són escassos; per això caldrà estudiar amb més detall les interaccions dels GLRaV amb els seus vectors, per comprendre millor l'ecologia i l'epidemiologia de la malaltia de l'enrotllament de la fulla de la vinya.

De les malalties víriques que afecten la vinya, la GLD està considerada la més destructiva de totes. Naidu *et al.* (2008) estimen que aquesta malaltia produeix el 60 % de les pèrdues de producció de raïm de tot el món degudes a malalties d'origen víric (en 2003, a l'estat de Nova York, quasi el 10 % de la superfície de vinya conreada tenia la GLD). La GLD afecta perjudicialment el creixement i el vigor de la vinya. Produeix una reducció d'àrea de les fulles i, amb el temps, el tronc dels ceps es torna dèbil i, per tant, disminueix el temps de vida de la planta i la producció de raïm. També la sobreexpressió d'alguns gens de la ruta biosintètica dels flavonols i la disminució de clorofil·la i carotenoides, que causen el canvi de coloració de les fulles, disminueixen l'eficièn-

## La malaltia de l'enrotllament de la fulla de vinya i virus associats

cia fotosintètica. Això repercuteix en el subministrament de carbohidrats i sucres als fruits i al tronc, cosa que afectarà negativament la qualitat del raïm i el desenvolupament dels ceps infectats per a les temporades següents (Naidu *et al.*, 2008). Més concretament, el GLRaV-3 redueix la grandària de les inflorescències de raïm, produeix un retard en la maduració dels fruits, canvia el color dels fruits amb la disminució del contingut d'antocianines, augmenta el contingut d'alguns àcids com el màlic o el tartàric i canvia la química del suc, o most, amb la reducció del contingut de sòlids solubles, amb la qual cosa se'n modifiquen les característiques aromàtiques.

Aquelles varietats de vinya en què no s'aprecien clarament els símptomes visuals clàssics també sofreixen aquests efectes negatius. S'ha vist, comparant els vins produïts a partir de vinyes infectades i sanes, que el raïm amb GLRaV-3 tenia menys pigments, fenols, tanins i menys alcohol que el vi elaborat amb raïm de vinyes sanes (Maree *et al.*, 2013). Aquesta malaltia té molts efectes negatius sobre els ceps infectats i un gran impacte en la producció de raïm d'alta qualitat per a fer vi. S'ha comprovat que la malaltia predisposa la vinya a sofrir més directament els efectes negatius dels climes freds (Pesqueira *et al.*, 2012). Per tot això resulta necessari poder detectar la infecció del virus a temps per prendre mesures que intenten controlar aquests impactes negatius en els conreus.

## 2. DETECCIÓ

La detecció dels virus a la vinya sempre ha sigut un repte. Les raons principals d'això són: que una sola planta pot estar infectada per més d'un virus; que els virus que no estan relacionats amb els que es volen detectar poden presentar una simptomatologia semblant; quan s'intenta detectar el virus en un hoste que acaba de ser infectat, segurament el virus es troba en una concentració molt baixa; els virus no es distribueixen homogèniament ni pel mateix hoste ni pel cultiu de vinya; hi pot haver cultius, com la vinya de raïm blanc, que no mostren símptomes de la infecció dels virus. Les tècniques més utilitzades avui dia són els mètodes serològics, els indicadors biològics, els mètodes basats en àcid nucleic i, en els últims anys, la seqüenciació de nova generació.

### 2.1. Mètodes serològics

Hi ha moltes tècniques de diagnòstic serològic, entre les quals s'inclouen els tests d'*immuno-strips*, tècniques d'immunofluorescència (IF) i els assajos ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). També s'utilitzen sèrums amb anticossos policlonals i, sobretot, monoclonals. La tècnica més utilitzada és

l'ELISA, perquè té molta fiabilitat, un alt rendiment, permet analitzar diverses mostres alhora, i també presenta sensibilitat, ja que permet amplificar el resultat de la mostra. Els dos desavantatges més grans de l'ELISA són que no és tan sensible com els mètodes basats en àcids nucleics i que resulta molt costós desenvolupar anticossos nous per als immunoassajos (O'Donnell, 1999). La fiabilitat de l'ELISA possibilitaria detectar totes les variants genètiques, però es desconeix si tots els *kits* comercials que es produeixen industrialment poden fer-ho (Maree *et al.*, 2013).

## **2.2. Indicadors biològics**

Fins a l'aparició de les tècniques serològiques a la darrera dels anys vuitanta, l'ús d'indicadors biològics era l'únic mètode fiable que hi havia. La tècnica es basa a empeltar un esqueix del cep que es vol testar en un altre cep, que serveix d'indicador per la seua capacitat d'expressar els símptomes de la malaltia (Constable *et al.*, 2010). Les varietats de *V. vinifera* més utilitzades com a indicadors són cabernet franc, pinot noir, cabernet sauvignon i Barbera. L'elecció de la varietat indicadora depèn de les condicions climàtiques de la zona on creixerà. Aquests indicadors, amb l'empelt fet, s'han de plantar i esperar que cresca i observar si hi apareixen símptomes de la malaltia. De vegades cal esperar dues temporades perquè cresca l'indicador i mostre, o no, els símptomes.

Una altra tècnica consisteix en l'empelt d'esqueixos verds en branques tendres, que és una manera d'evitar la incompatibilitat entre empelts que de vegades ocorre entre algunes varietats. A més, aquesta tècnica demostra una gran efectivitat (Walter *et al.*, 2008).

Els principals desavantatges dels indicadors biològics són: que resulta molt costós en treball i temps aplicar aquesta tècnica; no és possible identificar la varietat dels virus (menys en el cas del GLRaV-2); pot ser-hi present la infecció per virus i encara així no mostrar símptomes pel conjunt de variables que influeixen en l'expressió de la GLD, i, a més, es necessita un viròleg experimentat (recomanablement) per a confirmar la malaltia, ja que la interpretació dels símptomes és fàcil de confondre i, en part, és subjectiva (Constable *et al.*, 2010; Maree *et al.*, 2013).

## **2.3. Mètodes moleculars basats en àcids nucleics**

En els últims deu anys s'han desenvolupat molt les tècniques basades en àcids nucleics per als assajos de detecció de patògens que afecten les plantes. Sobretot, per als patògens amb el genoma de RNA, s'utilitza la RT-PCR; amb l'ús de la transcriptasa inversa (RT) a partir de l'RNA, es creen els cDNA,

els quals s'identifiquen amb la PCR. Els GLRaV es poden detectar tots amb aquesta tècnica, però algunes espècies, com el GLRaV-3, tenen moltes variants genètiques; per això s'utilitza la PCR-*multiplex*, la qual permet detectar més mostres i diferenciar les variants (Chooi *et al.*, 2012). Una altra tècnica de PCR és la *immunocapture PCR*, en què s'utilitzen anticossos produïts contra la proteïna major de la càpsida (CP), i s'immobilitza el virus a la superfície dels microtubs i es continua amb la RT-PCR (Ward *et al.*, 2004; Engel *et al.*, 2008; Nolasco, 2012). Altres tècniques de PCR desenvolupades amb molt d'èxit per a la detecció de virus de la vinya són la Spot-PCR, la LAMP (*loop-mediated amplification of nucleic acid*) amb la transcriptasa inversa afegida al protocol, i la PCR a temps real, que permet quantificar el DNA en qualsevol moment de l'amplificació mitjançant mesures de la fluorescència.

La RT-PCR a temps real amb sondes TaqMan s'utilitza comunament per detectar virus de la vinya. Té l'avantatge de l'especificitat de fluorescència dels DNA amplificats, però té l'inconvenient que cal dissenyar sondes específiques per cada estudi. Aquesta tècnica s'ha desenvolupat per a la detecció simultània del GLRaV-1, -2, -3, -4 i algunes de les seues varietats, i s'ha demostrat que és més eficaç que la RT-PCR (Osman *et al.*, 2007). També s'han utilitzat alternatives per detectar i diferenciar variants genètiques del GLRaV-3, com la SSCP (*single-strand conformation polymorphism*) (Turturo *et al.*, 2005).

La tècnica de les micromatrius d'oligonucleòtids permet detectar molts virus o gens al mateix temps, per la qual cosa és una eina d'alt rendiment, molt útil per a dur a terme programes de certificació de plançons (Engel *et al.*, 2010). Evidentment, com més seqüències virals es coneixen, més es podran millorar les deteccions de les distintes varietats de cada virus.

Com que algunes de les tècniques esmentades adés són massa cares per a usar-se d'una manera rutinària als laboratoris, s'hi poden trobar algunes alternatives. El grup de treball de Thompson *et al.* (2012) va desenvolupar un sistema de micromatrius per a la detecció múltiple de virus de la vinya en què l'equip necessari principal era un termociclador i un forn d'hibridació. D'aquesta manera es podia complementar amb altres mètodes moleculars, afegint el component de detecció múltiple, i abaratir-ne els costos (Thompson *et al.*, 2012).

### 2.4. Seqüenciació de nova generació

Les tècniques més utilitzades en el diagnòstic de malalties d'origen víric en la vinya han sigut l'ELISA, els indicadors biològics i els mètodes basats en àcids nucleics, com la RT-PCR. Encara que aquestes tècniques poden ser molt específiques i fiables, no tenen en compte la contribució d'altres virus, coneguts i desconeguts, implicats en l'etiologia de la malaltia. Variants del mateix

virus o virus distints poden no ser detectats per protocols molt específics de la RT-PCR. L'ús de seqüenciació metagenòmica pot determinar el contingut total viral d'una mostra i superar així les limitacions de les tècniques anomenades anteriorment. S'han desenvolupat instruments de segona generació o de nova generació de seqüenciació (NGS, en anglès) que eviten les limitacions de la seqüenciació de Sanger. L'ús d'adaptadors universals, en comptes d'encebadors amb una seqüència específica, permet a la NGS seqüenciar tot el material genètic d'una mostra, encara que no es coneixen els organismes que hi havia. Ara per ara la NGS resulta massa cara per a utilitzar-la en diagnòstics rutinaris, però es pot aplicar per millorar els assajos més usats i pot aportar informació sobre les malalties (freqüència dels distints virus en el material infectat i variants dominants dels virus) (Barba *et al.*, 2014; Maree *et al.*, 2013).

### **3. GESTIÓ DE LA MALALTIA GLD**

La clonació de material vegetal seleccionat i lliure de virus per a la producció de plançons és la manera preventiva i més efectiva de controlar la malaltia de l'enrotllament. La majoria dels agents causants de la malaltia poden ser eliminats del material vegetal infectat amb termoteràpia, combinada o no, amb el cultiu de teixits vegetals *in vitro*, embriogènesi somàtica, electroteràpia i quimioteràpia *in vitro* amb un ampli ventall de drogues. No es coneix cap varietat de *V. vinifera* totalment resistent a la malaltia. La protecció dels ceps sans al camp resulta molt difícil. És possible que cultivar vinya lluny dels cultius infectats i eliminar els ceps que comencen a mostrar símptomes ajude a alentir la propagació de la malaltia, però amb baixa eficàcia. Els equips i els instruments dels agricultors han de ser netejats abans i després d'entrar al camp, per tal de minimitzar la dispersió dels insectes vectors (Martelli, 2014).

L'ús de pesticides volàtils té cabuda en programes de control regional dels vectors, però no és efectiu contra la propagació dels virus. Els plaguicides sistèmics, siguen aplicats a les fulles, siga pel sistema d'irrigació, poden matar les cotxinilles que s'amaguen sota l'escorça o a les arrels, però si hi ha insectes sobre el cep, és molt probable que ja s'hagen alimentat del floema i puguen haver transmès virus. Les pràctiques culturals per al control dels insectes, com cobrir els cultius, exposar a l'ambient els insectes amagats sota l'escorça dels ceps o avançar la collita, tenen alguns efectes positius, però són molt costoses i moltes no s'han avaluat amb rigor (Daane *et al.*, 2012). Les trampes de feromones per a produir confusió sexual en les cotxinilles s'han utilitzat també, però s'ha comprovat que també capturaven els parasitoides de la plaga, i amb el temps això augmentava la població de les cotxinilles. El control biològic amb parasitoides s'ha utilitzat en moltes zones de cultius per la seua especificitat, però alguns d'aquests depredadors són molt sensibles al clima de la zona de cultiu de vinya (Daane *et al.*, 2012).

## La malaltia de l'enrotllament de la fulla de vinya i virus associats

També s'ha intentat aplicar l'enginyeria genètica per produir portaempelts resistents transgènics als virus GLRaV-2 i GLRaV-3, però no ha tingut èxit. Per tot això, resulta molt complicat arribar a controlar aquesta malaltia (Martelli, 2014).

### 4. CONCLUSIONS

La GLD o malaltia de l'enrotllament de la fulla de la vinya està considerada una de les malalties d'origen víric que afecten els cultius de vinya més destructiva econòmicament. La reducció de la productivitat d'un camp infectat pot variar des d'un 5 % fins a més del 60 % si la infecció és molt greu. Encara que les pèrdues en les collites anuals siguin limitades, la GLD té un impacte danyós acumulatiu, que afectarà la viabilitat i la producció del camp a llarg termini. Els estudis han determinat que l'agent etiològic principal de la malaltia és el GLRaV-3. Filogenèticament, aquest virus té sis grups de variants genètiques, i vist com avança el desenvolupament de les tecnologies de seqüenciament, cal esperar que se'n trobaran més variants. No es coneix el paper que exerceix cadascuna de les variants en la GLD, ni tampoc es coneixen bé les interaccions que tenen amb els seus vectors. Cal destacar la construcció de clons de cDNA del virus GLRaV-3 biològicament actius feta per Jarugula *et al.* (2012), i la seua utilitat a l'hora d'estudiar la replicació del genoma i l'expressió dels gens virals, la funció desconeguda d'alguns gens i també la funció de les regions del genoma amb alta variabilitat, com la 5'UTR. Serà necessari l'esforç d'investigar mètodes de detecció ràpids, relativament barats i prou sensibles per a detectar totes les variants del GLRaV-3 i els altres virus causants de la malaltia, per a esclarir els dubtes que hi ha en la seua transmissió i etiologia, a més a més de proveir tècniques assequibles per als vivers que comercien amb portaempelts i altres materials vegetals.

Les noves revisions sobre la taxonomia i la filogènia de la família *Closteroviridae*, que s'estan fent gràcies al nombre creixent de seqüències nucleotídiques completes disponibles, permeten entendre millor l'evolució, la genètica de poblacions i l'epidemiologia dels virus d'aquesta família, entre els quals els GLRaV.

Hi ha hagut una gran tasca de recerca en les darreres tres dècades, que ha acumulat milers de publicacions respecte a la malaltia de l'enrotllament i als virus associats, encara que haja disminuït el nombre de publicacions durant els últims anys. El conreu de vinya és econòmicament importantíssim per a molts països, a causa de la gran demanda que hi ha dels productes derivats del raïm. França, Itàlia, Espanya, els EUA i la Xina són els primers productors de vi del món, i Espanya és el país amb més superfície d'aquest conreu, segons l'informe estadístic de l'Organització Mundial de la Vinya i el Vi (OIV, 2013). Un conreu amb 7.528.000 ha arreu del món (OIV, 2012) ha

de concentrar l'atenció de molta gent, i és important no desatendre la malaltia d'origen víric més destructiva, que és la GLD.

És necessari tenir i aplicar bons programes de control i gestió de la malaltia a les regions on es cultiva la vinya. Es poden utilitzar molts mètodes i tècniques, com s'ha vist. Però el que sembla més important és que hi haja protocols de detecció dels agents etiològics als vivers que comercien amb plançons; que hi haja programes de quarantena i tècniques de diagnosi de les malalties per al material vegetal importat d'altres regions; la presència d'indicadors biològics a les zones de cultiu pot ser útil. I utilitzar pràctiques de cultiu raonables i fer ús del control biològic dels vectors sempre que siga possible són mesures preventives que poden ser eficaces en el control de la propagació de la malaltia.

## **5. AGRAÏMENTS**

Els autors agraeixen la correcció d'aquest text, efectuada pel Servei de Política Lingüística de la Universitat de València.

## **BIBLIOGRAFIA**

- ADAMS, I. P.; GLOVER, R. H.; MONGER, W. A.; MUMFORD, R.; JACKEVICIENE, E.; NAVALINSKIENE, M.; SAMUITIENE, M.; BOONHAM, N. (2009). «Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology». *Mol. Plant Pathol.*, núm. 10, p. 537-545.
- AGRANOVSKY, A. A.; KOONIN, E. V.; BOYKO, V. P.; MAISS, E.; FRÖTSCHL, R.; LUNINA, N. A.; ATABEKOV, J. G. (1994). «Beet Bellows closterovirus: complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease». *Virology*, núm. 198, p. 311-324.
- ALMEIDA, R. P. P.; DAANE, K. M.; BELL, V. A.; BLAISDELL, G. K.; COOPER, M. L.; HERRBACH, E.; PIETERSEN, G. (2013). «Ecology and management of grapevine leafroll disease». *Frontiers in Microbiol.*, núm. 4, article 94.
- BAHDER, B. W.; POOJARI, S.; ALABI, O. J.; NAIDU, R. A.; WALSH, D. B. (2013). «*Pseudococcus maritimus* and *Parthenolecanium corni* are capable of transmitting *Grapevine leafroll-associated virus 3* between *Vitis x labruscana* and *Vitis vinifera*». *Environ. Entomol.*, núm. 42, p. 1292-1298.
- BARBA, M.; CZOSNEK, H.; HADIDI, A. (2014). «Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology». *Viruses*, núm. 6, p. 106-136.
- BELL, V. A.; BONFIGLIOLI, R. G. E.; WALKER, J. T. S.; LO, P. L.; MACKAY, J. F.; MCGREGOR, S. E. (2009). «Grapevine leafroll-associated virus 3 persistence in *Vitis vinifera* remnant roots». *Journal of Plant Pathology*, 91 (3), p. 527-533.



- BESTER, R. (2012). *Sequencing and detection of a new strain of grapevine leafroll-associated virus 3 in South Africa* [en línia]. Tesi doctoral. Stellenbosch University. <<http://hdl.handle.net/10019.1/71743>>.
- BORN, E. van den; OMELCHENKO, M. V.; BEKKELUND, A.; LEIHNE, V.; KOONIN, E. V.; DOJJA, V. V.; FALNES, P. Q. (2008). «Viral AlkB proteins repair RNA damage by oxidative demethylation». *Nucleic Acids Res.*, núm. 36, p. 5451-5461.
- BOSS, P. K.; DAVIES, C.; ROBINSON, S. P. (1996). «Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour». *Aus. J. Grape Wine Res.*, núm. 2 (3), p. 163-170.
- CHOOI, K. M.; COHEN, D.; PEARSON, M. N. (2013). «Generic and sequence variant specific molecular assays for the detection of the highly variable *Grapevine leafroll-associated virus 3*». *J. Virol. Methods*, núm. 189, p. 20-29.
- CHOOI, K. M.; PEARSON, M. N.; COHEN, D.; MACDIARMID, R. M. (2012). «Development of generic and variant-specific molecular assays for the detection of the highly variable *Grapevine leafroll-associated virus 3*». A: *Proceedings of the 17th Congress of ICVG* (Davis, Califòrnia, 7-14 octubre 2012). Davis: University of California. Foundation Plant Services, p. 142-143.
- CONSTABLE, F. E.; NICHOLAS, P.; RODONI, B. C. (2010). «Development and validation of diagnostic protocols for the detection of endemic and exotic pathogens of grapevines» [en línia]. A: *Final report to grape and wine research & development corporation*. Victoria: Australian Government. Department of Primary Industries. <<http://www.gwrdc.com.au/wpcontent/uploads/2012/09/-DPI-0504.pdf>>.
- CONSTABLE, F.; RODONI, B. (2011). *Grapevine leafroll and associated viruses* [en línia]. Victoria: Australian Government. Grape and Wine Research and Development Corporation. <[http://www.gwrdc.com.au/resource\\_categories/virus/](http://www.gwrdc.com.au/resource_categories/virus/)>.
- DAANE, K. M.; ALMEIDA, R. P. P.; BELL, V. A.; WALKER, J. T. S.; BOTTON, M.; FALLAHZADEH, M.; MANI, M.; MIANO, J. L.; SFORZA, R.; WALTON, V. M.; ZAVIEZO, T. (2012). *Biology and management of mealybugs in vineyards. Arthropod Management in Vineyards: Pests, Approaches and Future Directions*. Edició a cura de N. J. Bostanian, C. Vincent i R. Isaacs. Nova York: Springer, p. 271-307.
- DOJJA, V. V. (2003). «Beet Bellows virus: The importance of being different». *Mol. Plant Pathol.*, núm. 4, p. 91-98.
- DOJJA, V. V.; KREUZE, J. F.; VALKONEN, J. P. T. (2006). «Comparative and functional genomics of closteroviruses». *Virus Res.*, núm. 117, p. 38-51.
- ENGEL, E. A.; ESCOBAR, P. F.; ROJAS, L. A.; RIVERA, P. A.; FIORE, N.; VALENZUELA, P. D. T. (2010). «A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses». *J. Virol. Methods*, núm. 163, p. 445-451.
- ENGEL, E. A.; GIRARDI, C.; ESCOBAR, P. F.; ARREDONDO, V.; DOMÍNGUEZ, C.; PÉREZ-ACLE, T.; VALENZUELA, P. D. (2008). «Genome analysis and detection of a Chilean isolate of *Grapevine leafroll associated virus 3*». *Virus Genes*, núm. 37, p. 110-118.

- ENGELBRECHT, D. J.; KASDORF, G. G. F. (1985). «Association of a closterovirus with grapevines indexing positive for grapevine leafroll disease and evidence for its natural spread in grapevine». *Phytopathol. Mediterr.*, núm. 24, p. 101-105.
- FUCHS, M.; MARSELLA-HERRICK, P.; LOEB, G. M.; MARTINSON, T. E.; HOCH, H. C. (2009). «Diversity of ampeloviruses in mealybug and soft scale vectors and in grapevine hosts from leafroll-affected vineyards». *Phytopathol.*, núm. 99, p. 1177-1184.
- GUGERLI, P. (2009). «25 years of serological identification of Grapevine leafroll-associated viruses: antiserum and monoclonal antibodies to GLRaV-1 to GLRaV-9». A: *Le Progrès Agricole et Viticole: 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine: Extended abstracts* (Dijon, França, 31 agost - 4 setembre 2009), p. 24-28. [Suplement]
- GUTHA, L. R.; CASASSA, L. F.; HARBERTSON, J. F.; NAIDU, R. A. (2010). «Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*V. vinifera* L.) leaves». *BMC Plant Biology*, núm. 10, p. 187.
- HALL, T. A. (1999). «Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT». *Nucleic Acids Symp. Ser.*, núm. 41, p. 95-98.
- HERNÁNDEZ, I.; ALEGRE, L.; BREUSEGEM, F. van; MUNNÉ-BOSCH, S. (2009). «How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?». *Trends Plant Sci.*, núm. 14, p. 125-132.
- JARUGULA, S.; GOWDA, S.; DAWSON, W. O.; NAIDU, R. A. (2010). «3'-coterminal subgenomic RNAs and putative cis-acting elements of Grapevine leafroll-associated virus 3 reveals "unique" features of gene expression strategy in the genus Ampelovirus». *Virology J.*, núm. 7, p. 180.
- (2012). «Development of full length infectious cDNA clone of grapevine leafroll-associated virus 3». A: *Proceedings of the 17th Congress of ICVG* (Davis, Califòrnia, 7-14 octubre 2012). Davis: University of California. Foundation Plant Services, p. 70-71.
- JOOSTE, A. E. C.; GOSZCZYNSKI, D. E. (2005). «Single-strand conformation polymorphism (SSCP), cloning and sequencing reveal two major groups of divergent molecular variants of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)». *Vitis*, núm. 44, p. 39-43.
- JOOSTE, A. E. C.; MAREE, H. J.; BELLSTEDT, D. U.; GOSZCZYNSKI, D. E.; PIETERSEN, G.; BURGER, J. T. (2010). «Three grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) variants identified from South African vineyards show high variability in their 5'UTR». *Arch. Virol.*, núm. 155, p. 1997-2006.
- JOOSTE, A. E. C.; PIETERSEN, G.; BURGER, J. T. (2011). «Distribution of grapevine leafroll associated virus 3 variants in South African vineyards». *Eur. J. Plant Pathol.*, núm. 131, p. 371-381.

## La malaltia de l'enrotllament de la fulla de vinya i virus associats

- KLAASSEN, V. A.; SIM, S. T.; DANGL, G. S.; OSMAN, F.; AL RWAHNIH, M.; ROWHANI, A.; GOLINO, D. A. (2011). «*Vitis californica* and *Vitis californica* × *Vitis vinifera* hybrids are hosts for *Grapevine leafroll-associated virus -2* and *-3* and *Grapevine virus A* and *B*». *Plant Dis.*, núm. 95, p. 657-665.
- KORKINA, L. G. (2007). «Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health». *Cell. Mol. Biol.*, núm. 53, p. 15-25.
- LING, K. S.; ZHU, H. Y.; GONSALVES, D. (2004). «Complete nucleotide sequence and genome organization of *Grapevine leafroll-associated virus 3*, type member of the genus *Ampelovirus*». *J. Gen. Virol.*, núm. 85, p. 2099-2102.
- LOLE, K. S.; BOLLINGER, R. C.; PARANJAPE, R. S.; GADKARI, D.; KULKARNI, S. S.; NOVAK, N. G.; INGERSON, R.; SHEPPARD, H. W.; RAY, S. C. (1999). «Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination». *J. Virol.*, núm. 73, p. 152-160.
- MAGUET, J. le; BEUVE, M.; HERRBACH, E.; LEMAIRE, O. (2012). «Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*». *Phytopathol.*, núm. 102, p. 717-723.
- MAREE, H. J.; ALMEIDA, R.; BESTER, R.; CHOOI, K.; COHEN, D.; DOJJA, V.; FUCHS, M.; GOLINO, D.; JOOSTE, A.; MARTELLI, G.; NAIDU, R.; ROWHANI, A.; SILDARELLI, P.; BURGER, J. (2013). «Grapevine leafroll-associated virus 3». *Frontiers in Microbiol.*, núm. 4, article 82.
- MARTELLI, G. P. (2014). «Grapevine leafroll». *J. Plant. Pathol.*, núm. 96 (1S), p. 51-70.
- MARTELLI, G. P.; AGRANOVSKY, A. A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCIA, D.; CANDRESSE, T.; COUTTS, R. H. A.; DOJJA, V. V.; FALK, B. W.; GONSALVES, D.; JELKMANN, W.; KARASEV, A. V.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; VETTEN, H. J.; WISLER, G. C.; YOSHIKAWA, N. (2011). «Family *Closteroviridae*. A: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Edició a cura d'A. King, M. J. Adams, E. B. Carstens i E. Lefkowitz. Amsterdam: Elsevier-Academic Press, p. 987-1001.
- MARTELLI, G. P.; AGRANOVSKY, A. A.; RWAHNIH, M. al; DOJJA, V. V.; DOVAS, C. I.; FUCHS, M.; KATIS, N. I. (2012). «Taxonomic revision of the family *Closteroviridae* with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus *Ampelovirus* and the putative species unassigned to the family». *J. Plant Pathol.*, núm. 94, p. 7-19.
- MORENO, P.; AMBRÓS, S.; ALBIACH-MARTÍ, M. R.; GUERRI, J.; PEÑA, L. (2008). «*Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry». *Mol. Plant Pathol.*, núm. 9, p. 251-268.
- NAIDU, R. A.; O'NEIL, S.; WALSH, D. (2008). «Grapevine leafroll disease» [en línia]. *WSU Extension Bulletin EB2027E*. 20 p. <<http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/eb2027e/eb2027e.pdf>>.

- NAMBA, S.; YAMASHITA, S.; DOI, I.; YORA, K.; YANO, R. (1979). «Grapevine leafroll virus, a possible member of closteroviruses». *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, núm. 45, p. 497-502.
- NOLASCO, G. (2012). «New developments in pathogen detection and identification». *Acta Hortic.*, núm. 940, p. 615-630.
- O'DONNELL, K. (1999). «Plant pathogen diagnostics: present status and future developments». *Potato Res.*, núm. 42, p. 437-447.
- ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO (OIV) (2012). «Statistics of the world vitiviniculture sector» [en línea]. <<http://www.oiv.int/oiv/info/espublicationsstatistiques>>.
- (2013). «Statistics of the world vitiviniculture sector» [en línea]. <<http://www.oiv.int/oiv/info/espublicationsstatistiques>>.
- 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*, núm. 141 (1), p. 22-29.
- PALUKAITIS, P. (2011). «The Road to RNA Silencing is paved with plant-virus interactions». *Plant Pathol. J.*, núm. 27, p. 197-206.
- PEREIRA-CRESPO, S.; SEGURA, A.; GARCÍA-BERRIOS, J.; CABALEIRO, C. (2012). «Partial defoliation improves must quality of cv. Albariño infected by *grapevine leafroll associated virus 3*». *Phytopathol. Mediterr.*, núm. 54, p. 383-389.
- PEREMYSLOV, V. V.; ANDREEV, I. A.; PROKHNEVSKY, A. I.; DUNCAN, G. H.; TALIANSKY, M. E.; DOIJA, V. V. (2004). «Complex molecular architecture of beet yellows virus particles». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 101, p. 5030-5035.
- PESQUEIRA, A. M.; GARCÍA-BERRIOS, J. J.; BARRASA, M.; CABALEIRO, C. (2012). «Economic impact of leafroll disease in vineyards of the cultivar Albariño in Rías Baixas». A: *Proceedings of the 17th Congress of ICVG* (Davis, California, 7-14 octubre 2012). Davis: University of California. Foundation Plant Services, p. 57-58.
- PIETERSEN, G. (2006). «Spatio-temporal distribution dynamics of grapevine leafroll disease in Western Cape vineyards». A: *15th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine: Extended abstracts* (Stellenbosch, Sud-àfrica, 3-7 abril 2006). South African Society for Enology and Viticulture, p. 126-127.
- ROOSSINCK, M. J. (2011). «The good viruses: viral mutualistic symbioses». *Nat. Rev. Microbiol.*, núm. 9, p. 99-108.
- RUBIO, L.; GUERRI, J.; MORENO, P. (2013). «Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*». *Frontiers in Microbiology*, núm. 4, article 151.
- SATYANARAYANA, T.; GOWDA, S.; AYLON, M. A.; DAWSON, W. O. (2004). «Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 101, p. 799-804.

## La malaltia de l'enrotllament de la fulla de vinya i virus associats

- SEAH, Y. M.; SHARMA, A. M.; ZHANG, S.; ALMEIDA, R. P. P.; DUFFY, S. (2012). «A divergent variant of *Grapevine leafroll-associated virus 3* is present in California». *Viol. J.*, núm. 9, p. 235.
- SHARMA, A. M.; WANG, J.; DUFFY, S.; ZHANG, S.; WONG, M. K.; RASHED, A.; COOPER, M. L.; DAANE, K. M.; ALMEIDA, R. P. P. (2011). «Occurrence of grapevine leafroll-associated virus complex in Napa Valley». *PLoS ONE*, núm. 6, p. e26227.
- THOMPSON, J. R.; FUCHS, M.; FISCHER, K. F.; PERRY, K. L. (2012). «Macroarray detection of grapevine leafroll-associated viruses». *J. Virol. Methods*, núm. 183, p. 161-169.
- TREUTTER, D. (2006). «Significance of flavonoids in plant resistance: a review». *Environ. Chem. Lett.*, núm. 4, p. 147-157.
- TSAI, C. W.; CHAU, J.; FERNANDEZ, L.; BOSCO, D.; DAANE, K. M.; ALMEIDA, R. P. P. (2008). «Transmission of *Grapevine leafroll-associated virus 3* by the vine mealybug (*Planococcus ficus*)». *Phytopathol.*, núm. 98, p. 1093-1098.
- TSAI, C. W.; ROWHANI, A.; GOLINO, D. A.; DAANE, K. M.; ALMEIDA, R. P. P. (2010). «Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: an analysis of virus-vector specificity». *Phytopathol.*, núm. 100, p. 830-834.
- TURTUREO, C.; SILDARELLI, P.; YAFENG, D.; DIGIARO, M.; MINAFRA, A.; SAVINO, V.; MARTELLI, G. P. (2005). «Genetic variability and population structure of *Grapevine leafroll-associated virus 3* isolates». *Journal of General Virology*, núm. 86, p. 217-224.
- WALTER, B.; BASS, P.; LEGIN, R.; MARTIN, C.; VERNOY, R.; COLLAS, A.; VESSELLE, G. (2008). «The use of a green-grafting technique for the detection of virus-like diseases of the grapevine». *J. Phytopathol.*, núm. 128, p. 137-145.
- WANG, J.; SHARMA, A. M.; DUFFY, S.; ALMEIDA, R. P. P. (2011). «Genetic diversity in the 30 terminal 4.6-kb region of *Grapevine leafroll associated virus 3*». *Phytopathol.*, núm. 101, p. 445-450.
- WARD, E.; FOSTER, S. J.; FRAAIJE, B. A.; MCCARTNEY, H. A. (2004). «Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches». *Ann. Appl. Biol.*, núm. 145, p. 1-16.