

TITRE DU PROJET

**DÉTECTION SIMULTANÉE DU VIROME DE LA VIGNE ET RÔLE DES FACTEURS BIOTIQUES ET
ABIOTIQUES SUR L'EXPRESSION DES SYMPTÔMES DE VIROSE DANS LA VIGNE**

NUMÉRO DU PROJET

DURÉE DU PROJET : 2020-01-01 AU 2024-12-01

RAPPORT FINAL

Réalisé par :

Mamadou L. Fall (Agriculture and Agroalimentaire Canada)

Peter Moffett (Université de Sherbrooke)

Vahid Jalali Javaran (AAC, UdeS)

DATE

2025-11-06

Les résultats, opinions et recommandations exprimés dans ce rapport émanent de l'auteur ou des auteurs et n'engagent aucunement le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

**TITRE DU PROJET : DÉTECTION SIMULTANÉE DU VIROME DE LA VIGNE ET RÔLE DES FACTEURS
BIOTIQUES ET ABIOTIQUES SUR L'EXPRESSION DES SYMPTÔMES DE VIROSE DANS LA VIGNE**

NUMÉRO DU PROJET : 19-005-2.2-C-USHERB

RÉSUMÉ DU PROJET ET DE SON AVANCEMENT

L'industrie viticole du Québec vit une transformation inédite au niveau de l'expansion du nombre et de la taille des vignobles, ainsi que le virage vers des cépages non rustiques. Le secteur viticole québécois est confronté à de nouveaux défis pour maintenir sa croissance et rester compétitif sur un marché mondialisé. Parmi ces défis, l'association des vignerons du Québec (AVQ) a identifié les virus, dans son plan de recherche et développement, comme étant l'un des principaux facteurs biotiques limitant la production. Le plan directeur en recherche et innovation de l'industrie vitivinicole au Québec identifie le besoin d'adaptation et d'innovation pour la détection et le suivi des virus en viticulture. En effet, les virus occasionnent des pertes considérables dans toutes les régions viticoles du monde. Plus de 95 virus s'attaquent à la vigne, pouvant réduire sa vigueur, sa productivité ou la qualité des raisins. On sait qu'un bon nombre ces virus sont latents ou asymptomatiques. Par conséquent, si la gestion des maladies virales repose principalement sur la certification des plants de vigne et le dépistage précoce des virus, un outil de détection simultanée de l'ensemble des virus (virome) devient plus que nécessaire. Actuellement le laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection (LEDP) du MAPAQ ne dispose pas d'un tel outil. L'objectif de cette demande est de développer une méthode robuste, rapide et peu coûteuse pour identifier tous les virus en utilisant des dispositifs de séquençage portables pour la détection précoce. L'outil servira à l'étude comparative du virome de vignes symptomatiques par rapport celui de vignes asymptomatiques afin de comprendre le rôle des facteurs biotiques et abiotiques sur le développement des symptômes.

La situation sanitaire liée à la COVID19 a eu un impact significatif dans ce projet. Néanmoins, le projet a connu d'important avancement et nous avons rattrapé le retard et atteint les objectifs du projet. Pour réaliser les objectifs, des échantillons de feuilles de vigne symptomatiques et asymptomatiques collectés durant les saisons de croissance de 2019-2022 ont été utilisés. Les acides nucléiques ont été extraits de deux manières, par l'extraction d'ARN double brins et l'extraction d'ARN total. Les extraits d'acides nucléiques ont été séquencés sur la plateforme d'Illumina Miseq et la plateforme d'Oxford Nanopore Technologies Minlon (ONT). Les résultats ont montré que les mêmes virus et viroïdes ont été détectés dans les deux plateformes. L'utilisation de dsRNA comme matériel génique de départ pour le séquençage au nanopore est plus efficace et moins coûteuse que le séquençage de l'ARN total. L'outil a aussi été validé dans plusieurs autres cultures, notamment, le concombre, tomate, céleri, poivron, cantaloup, citrouille, etc. et a offert des performances comparables au séquençage par Illumina Miseq. À la demande du LEDP, nous avons optimisé et simplifié le protocole de purification de dsRNA en réduisant le nombre d'étapes, tout en l'adaptant à différentes quantités de matériel de départ (2 g, 400 mg et 200 mg de feuilles). Tous les protocoles de purification des acides nucléiques, de préparation des bibliothèques et de séquençage ont été transférés au LEDP. De plus, des séances de formation théoriques et pratiques ont été organisées afin de faciliter le transfert de l'outil d'AAC vers le LEDP.

Pour le deuxième objectif d'approfondir nos connaissances sur le rôle des facteurs biotiques et abiotiques sur l'apparition de symptômes de virose, plusieurs essais ont été réalisés et les résultats nous ont permis de voir que peu importe les cultivars de vigne, un virome très diversifié a été détecté à la fois dans les plants asymptomatiques et symptomatiques et une grande majorité (83,33%) des plantes n'ont exprimé des symptômes de virose qu'au cours de l'automne. Ceci est cohérent avec les études qui ont montré que les symptômes de virose dans la vigne sont plus fréquents pendant la saison d'automne. Cependant, nos résultats ont montré que dans 75 % des cas, l'abondance virale n'a pas changé ou diminué entre les deux temps de prélèvement (été et automne) même si 87,5 % des plantes symptomatiques ont exprimé des symptômes au cours de l'automne. De plus, il y avait un manque d'association entre l'abondance relative des virus de l'enroulement 3 (GLRaV3) et le virus du pinot gris (GPGV), qui sont connus pour provoquer des symptômes, et l'expression des symptômes. Ces résultats

étaient inattendus, car il est admis dans la littérature scientifique que la charge virale est corrélée à l'expression des symptômes et que les vignes symptomatiques contiennent significativement plus de virus que celles asymptomatiques. Ce résultat a un impact majeur pour le diagnostic des virus de la vigne, car la capacité à détecter les virus par des méthodes conventionnelles (par exemple PCR, ELISA, etc.) peut être compromise par de faibles charges virales. Un autre facteur important qui peut expliquer le moment d'apparition des symptômes de virose pourrait être la coinfection avec différents virus. Même si la plupart des virus et viroïdes détectés dans nos échantillons sont des membres du virome sournois "background virome" (HSVd, GYSVd, GRSPaV etc.), qui ne sont pas connus pour causer des symptômes chez les cultivars utilisés dans notre étude, l'impact de ces virus en infection mixte est inconnu. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que le changement dans la composition du virome (espèces présentes), en particulier le virome de fond, entre nos deux temps d'échantillonnage peut expliquer la divergence dans le moment d'apparition des symptômes de virose.

OBJECTIFS

L'objectif général du projet est de développer une méthode robuste, rapide et peu coûteuse pour identifier le virome de la vigne et de déterminer le rôle des facteurs biotiques et abiotiques sur le développement des symptômes. L'objectif 1 permettra de développer une méthode de détection des virus de la vigne robuste, rapide et peu coûteuse que pourra notamment utiliser le LEDP. L'outil développé dans l'objectif 1 sera revalidé durant les activités de l'objectif 2 qui permettra d'étudier le rôle que jouent les facteurs biotiques et abiotiques sur l'apparition de symptômes de virose, afin de mieux interpréter les résultats de séquençage.

I. Objectif 1 : Développer un outil moléculaire pour identifier simultanément tous les virus (virome)

Objectif spécifique 1.1 : Établir le meilleur protocole d'extraction d'acides nucléiques et de préparation des bibliothèques de séquençage

objectif spécifique 1.2 : Augmenter la rapidité de la détection des virus de la vigne

Les hypothèses spécifiques cherchent à évaluer la meilleure méthode d'extraction des acides nucléiques viraux pour une détection efficace des virus. La comparaison de l'extraction d'acide nucléique viral par ARN double brins et celui par ARN total est présentée à la figure 1.

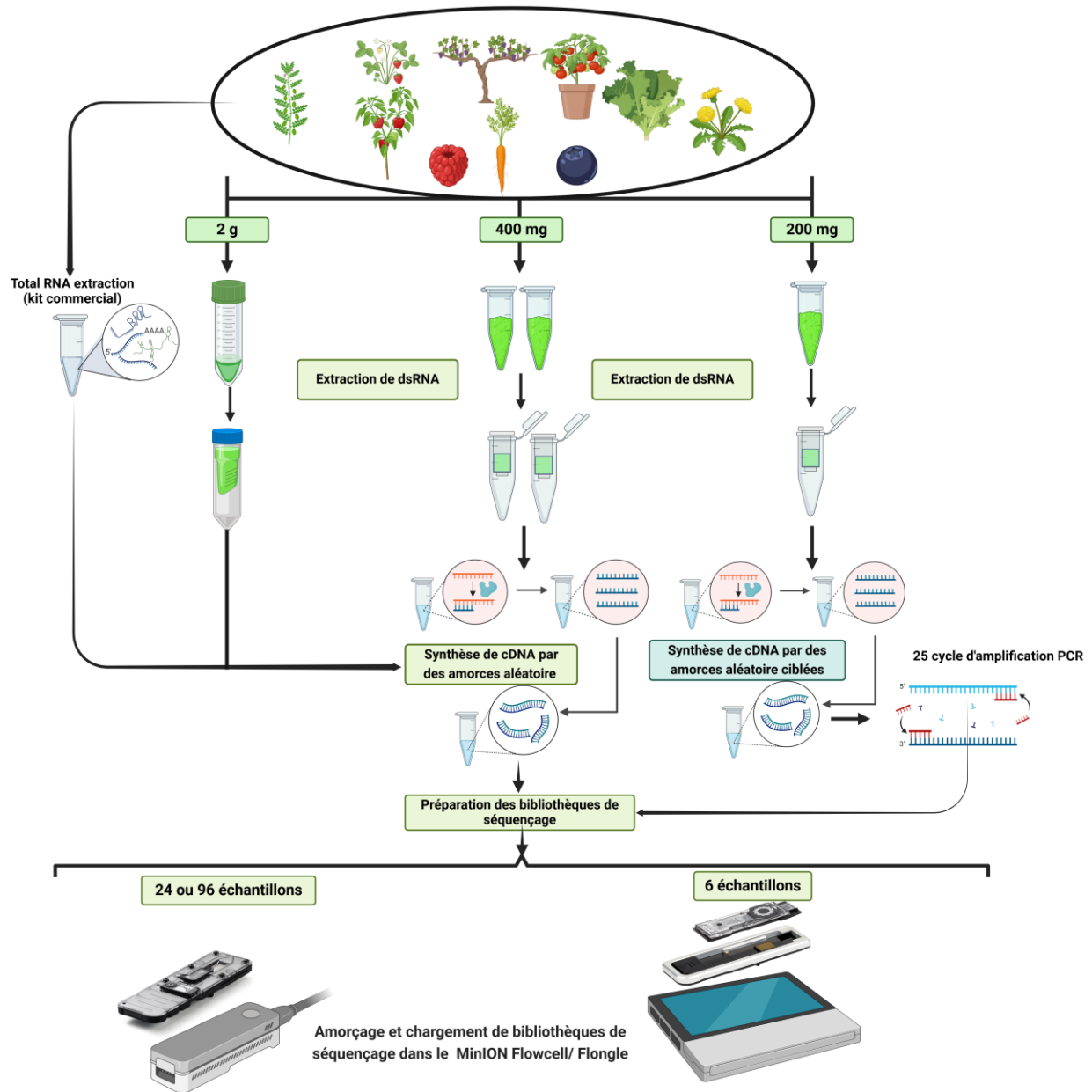


Figure 1 : Protocole de comparaison entre l'extraction d'acides nucléiques viraux par ARN double brins et par ARN total. Biorender.

APERÇU DE LA MÉTHODOLOGIE

Matériel végétal utilisé et extraction d'acides nucléiques : Tous les échantillons de feuilles infectées de la vigne ont été prélevés au cours des saisons de croissance de 2019 à 2022 dans différents vignobles (8 au total) du Québec et disponibles dans le laboratoire de virologie au Centre de recherche et de développement de Saint-Jean-sur-Richelieu, AAC. L'efficacité et la fiabilité des deux méthodes d'extractions (dsRNA et total RNA) pour la détection des virus par séquençage nanopore ont été évaluées. La méthode standard pour la comparaison est le séquençage par Illumina Miseq. Les différents protocoles d'extractions d'acides nucléiques, de synthèse d'ADN complémentaire et d'amorçage, chargement des bibliothèques sur la "Flow Cell" sont consignées dans documents distincts qui ont déjà été transférés au laboratoire du LEDP.

Analyse des données : Un flux opérationnel (workflow) pour le prétraitement, l'analyse des données et le pointage de la base de données brutes de MinION a été développé et transféré au laboratoire du LEDP (Figure 2).

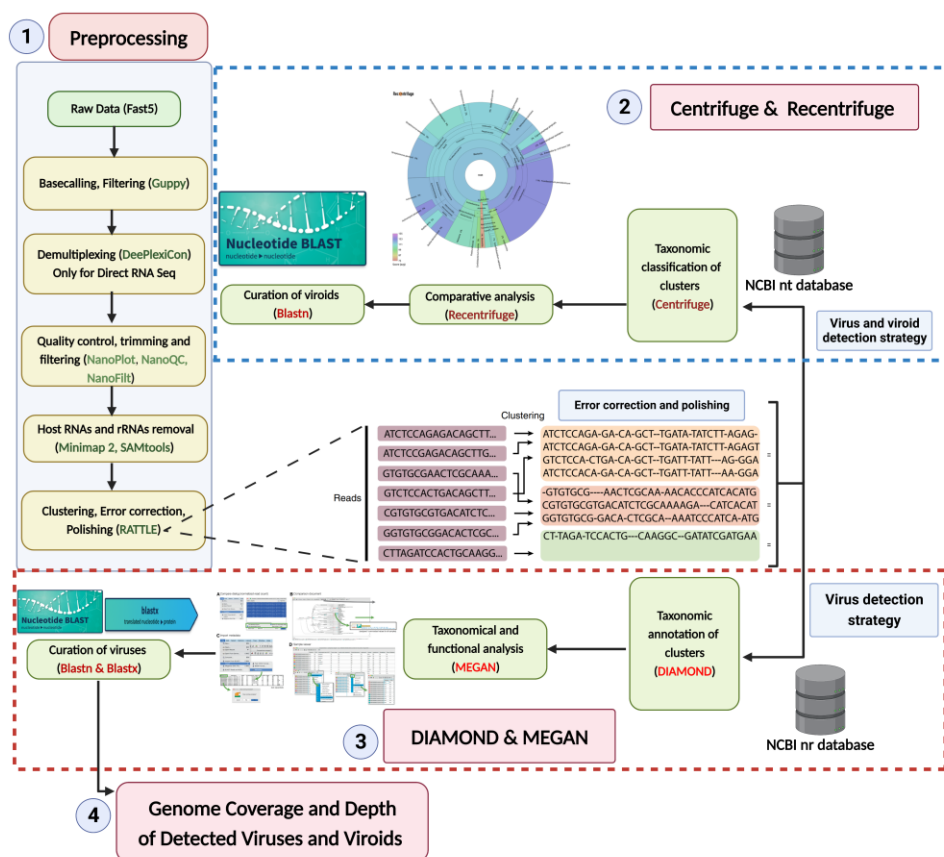


Figure 2 : Les étapes de traitement et d'analyse de données pour la détection des virus et des viroïdes de la vigne par séquençage nanopores. 1-Prétraitement des données brutes (à gauche): les données brutes ont été acquises via le logiciel MinkNOW, puis l'appel de base, le filtrage basé sur le score de qualité (<7), le démultiplexage, le découpage, la suppression des lectures d'hôte et le regroupement ont été effectués, suivis de correction d'erreurs et polissage, à l'aide de divers logiciels et progiciels. 2-Stratégie Centrifuge et Recentrifuge (en haut à droite) : les lectures prétraitées ont été classées taxonomiquement à l'aide de Centrifuge, suivies d'une analyse complète par Recentrifuge, qui a fourni une visualisation. 3-Stratégie DIAMOND + MEGAN (en bas à droite) : De plus, les mêmes lectures de l'étape précédente ont été alignées

sur des séquences protéiques annotées (NCBI-nr) à l'aide de DIAMOND, puis MEGAN a été utilisé pour regrouper les séquences en fonction de leur taxonomie et de leur fonction. 4-Pour peaufiner les résultats taxonomiques, BLASTn et BLASTx ont également été exécutés.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS

Efficacité de la préparation et du séquençage des bibliothèques

Le but de cette étude était de développer et d'évaluer deux types de stratégies de séquençage de nanopores, le séquençage d'ARN total (rdTotalRNA) et le séquençage d'ARN double brins (dsRNACD), pour la détection des virus et viroïdes de la vigne. La bibliothèque de dsRNA regroupée de 24 échantillons de vigne différents a été séquencée et a donné un total de 1 754 037 lectures en 24 heures. Aussi, 23 échantillons avec des code-barres spécifiques ont été séquencés sur une autre "Flow Cell" et ont donné 2 921 438 lectures. De plus, pour comparer l'utilisation des dsRNA et des ARN totaux comme matières premières, ces échantillons susmentionnés ont été utilisés pour l'extraction d'ARN total et la préparation de bibliothèques de séquençage direct d'ARN. Après le séquençage de la bibliothèque rdTotalRNA, les 541 972 lectures produites ont été démultiplexées. Le séquençage dsRNACD par Illumina MiSeq a également produit en moyenne 460 000 séquences avec des scores de qualité supérieurs à Q30 à partir des échantillons. Pour le traitement et le séquençage des échantillons, le séquençage rdTotalRNA (29,17 h) et le séquençage dsRNACD (37,58 h) se sont avérés plus rapides que le séquençage Illumina dsRNA-MiSeq (88,72 h). Le séquençage Nanopore rdTotalRNA était en moyenne 2 fois plus rapide que le séquençage nanopore dsRNACD. En termes de coût de séquençage, le séquençage nanopore dsRNACD était nettement moins cher (103 \$ CAN par échantillon) que le séquençage nanopore rdTotalRNA (350 \$ CAN par échantillon) et le séquençage Illumina dsRNA-MiSeq (412 \$ CAN par échantillon). En ajoutant des barres codes spécifiques, nous pouvons séquencer au nanopore le dsRNACD de 96 échantillons pour un coût estimé à 22 \$ par échantillon.

Prétraitement, regroupement et correction d'erreurs de longues lectures

Les statistiques sur les données brutes ont révélé que, même si tous les échantillons avec code-barres étaient regroupés à des concentrations égales, le nombre de lectures séquencées variait entre les échantillons. Les protocoles de séquençage Nanopore sont optimisés pour les longues lectures. Étant donné que plusieurs étapes de purification des billes ont été effectuées à des ratios différents lors de la préparation de la bibliothèque, les échantillons contenant de courts fragments d'acide nucléique ont perdu plus de séquences, ce qui a entraîné moins de lectures que ceux contenant de longs fragments (Oxford Nanopore Technologies, 2016). La qualité moyenne des lectures dans tous les échantillons a été améliorée par découpage et filtrage. De plus, l'analyse des lectures indésirables liées aux données de séquençage de l'ARN total (rdTotalRNA) a révélé une proportion de 47 à 67 % de lectures brutes qui appartenait à l'hôte, tandis que la proportion de lectures liées à l'hôte dans les données de séquençage d'ARN double brins (dsRNACD) variait de 21 % à 65 %. La correction des erreurs et le regroupement des lectures ont également augmenté la qualité moyenne des lectures corrigées dans les deux types de données de séquençage de nanopores avant la classification taxonomique.

Stratégie d'analyse des données 1 : Centrifugeuse et recentrifugeuse (Cent&Rec)

Pour les ensembles de données de séquençage dsRNACD et rdTotalRNA, une base de données d'index personnalisée contenant les séquences complètes du génome de tous les virus possibles a été utilisée par le classificateur Centrifuge pour la classification taxonomique (Kim et al., 2016). Le classificateur Centrifuge est un classificateur sensible et rapide, conçu pour classer les séquences et traiter avec précision des millions de lectures en quelques minutes (Watts et al., 2019). La fréquence des lectures qui ne pouvaient pas être taxonomiquement attribuées aux séquences dans notre base de données d'index personnalisée

variait entre les bibliothèques dsRNACD et rdTotalRNA, allant de 36,5 % à 55 % pour les bibliothèques dsRNACD et de 1,5 % à 16 % pour les bibliothèques rdTotalRNA. Certaines des lectures non attribuées dans les bibliothèques dsRNACD peuvent avoir été liées à de nouvelles espèces de virus ou à des virus connus qui n'étaient pas présents dans notre base de données. Bien que différentes plates-formes de séquençage et flux de travail d'analyse aient été utilisés pour le séquençage nanopore et MiSeq, nous avons utilisé la même base de données d'index pour les classifications taxonomiques des lectures longues et courtes. Le logiciel Recentrifuge (Martí et al., 2019) a été utilisé pour effectuer une analyse comparative des résultats de la classification taxonomique, avec à la fois les résultats visuels basés sur les scores et les résultats peuvent être extraits sous forme de graphiques HTML et/ou en fichiers Excel. Les lectures liées à l'hôte ont été initialement soustraites de tous les échantillons pour améliorer la précision de la classification taxonomique et augmenter les portions de lecture virale. Plusieurs études ont montré que la soustraction des séquences co-extraites de l'hôte réduit le temps de CPU requis pour la classification taxonomique et aide à révéler et à caractériser les séquences virales présentes à de faibles titres (Daly et al., 2015 ; Miller et al., 2018). La partie virale des lectures attribuées dans les bibliothèques dsRNA séquencées était significativement plus élevée (de l'ordre de 85 % à 95 %) que celles des bibliothèques d'ARN total séquencées (de l'ordre de 6 % à 21 %).

Les virus de haricot utilisés comme témoin positif (*Phaseolus vulgaris* alphaendornavirus-1, 2 et 3; PvEV1, PvEV2 et PvEV3) ont été détectés dans tous les échantillons d'DsRNA. Les méthodes de séquençage dsRNACD et dsRNA-MiSeq ont détecté les mêmes virus de la vigne dans les échantillons. En revanche, le séquençage rdTotalRNA n'a pas réussi à détecter la plupart des virus trouvés par dsRNACD et dsRNA MiSeq. Ces résultats suggèrent que le séquençage nanopore dsRNACD est plus sensible aux virus à faible abondance que le séquençage rdTotalRNA et produit des résultats similaires à dsRNA-MiSeq.

Le flux de traitement Cent&Rec a également été utilisé pour comparer les performances de l'DsRNA et de l'ARN total dans la détection des viroïdes. Une espèce de viroïde, le viroïde de Citrus exocortis (CEVd), a été détectée exclusivement dans les résultats de séquençage de rdTotalRNA pour l'échantillon CO-9-86J. Cependant, l'absence de CEVd dans les résultats de séquençage dsRNACD et dsRNA-MiSeq soulève le soupçon que les lectures attribuées au CEVd dans l'ensemble de données rdTotalRNA pourraient être liées à l'hôte ou à d'autres micro-organismes. Pour tester cela, les lectures attribuées au CEVd ont été extraites de l'ensemble de données rdTotalRNA de l'échantillon CO-9-86J. L'alignement BLAST par rapport aux bases de données ViroidDB et NCBI-nt a montré que toutes les lectures attribuées par le CEVd étaient liées à la vigne (*Vitis spp.*). À l'aide du numéro d'identification, la séquence CEVd (FJ751964.1) dans ViroidDB qui a été attribuée à nos séquences a été récupérée sur le site Web du NCBI. Selon l'alignement BLAST par rapport à la base de données NCBI-nt, une similarité de 99,46 % a été trouvée entre la séquence CEVd dans ViroidDB et les séquences de vignes (*Vitis spp.*), ce qui indique que la séquence a été annotée par erreur comme CEVd dans la base de données ViroidDB. Ce résultat indique que le séquençage nanopore dsRNACD était plus fiable que le séquençage de rdTotalRNA pour la détection des viroïdes, même avec l'utilisation d'une base de données dédiée et spécialisée pour les viroïdes.

Stratégie d'analyse des données 2 : DIAMOND et MEGAN (DIA&MEG)

En plus du flux de travail Cent&Rec, nous avons également utilisé le flux de travail DIA&MEG pour la détection de virus. DIAMOND a été utilisé pour aligner les lectures sur la base de données de protéines (NCBI-nr), puis MEGAN a regroupé les alignements en fonction des informations taxonomiques et fonctionnelles. Étant donné que les génomes viroïdes ne codent pas pour les protéines, cette stratégie ne peut être utilisée que pour détecter les virus. Les virus détectés par Cent&Rec dans les jeux de données dsRNACD et dsRNA-MiSeq ont également été détectés par DIA&MEG.

Les résultats du flux de traitement DIA&MEG étaient généralement similaires à ceux du flux de travail Cent&Rec, à l'exception de la détection de GRSPaV, GVB et GEEV. GRSPaV a été détecté dans seulement deux des trois ensembles de données rdTotalRNA lors de l'utilisation du flux de travail DIA&MEG avec des paramètres par défaut, mais a été détecté dans les trois ensembles de données rdTotalRNA lors de l'utilisation du flux de travail Cent&Rec. Dans l'ensemble de données rdTotalRNA de l'échantillon BV-12-16J, GVB et GRSPaV (de la famille Betaflexiviridae) ont été détectés par Cent&Rec, mais pas par DIA&MEG. Cependant, 32 lectures dans l'ensemble de données rdTotalRNA de l'échantillon BV-12-16J ont été assignées taxonomiquement au niveau de la famille aux Betaflexiviridae. Ce résultat peut s'expliquer par les options de seuil par défaut du logiciel MEGAN. Cependant, lorsque les options de seuil "Min Support Percent" et "Min Support" ont été désactivées (= 0), ces 32 lectures ont été assignées taxonomiquement au niveau de l'espèce à GRSPaV et GVB. De plus, l'ensemble de données rdTotalRNA de l'échantillon BV-12-16J avait très peu de lectures virales (34 lectures). Le petit nombre de lectures virales dans cet ensemble de données rend une classification taxonomique précise risquée. En revanche, les virus GRSPaV et GVB dans les ensembles de données dsRNACD et dsRNA-MiSeq ont été regroupés correctement en fonction de leur taxonomie, même lors de l'utilisation des options de seuil par défaut dans le logiciel MEGAN.

Une différence a également été observée dans la détection de GEEV dans les jeux de données d'DsRNA et d'ARN total. Aucune lecture dans l'ensemble de données rdTotalRNA de l'échantillon BIO-15-56S n'a été cartographiée sur le génome du GEEV, tandis que les ensembles de données dsRNACD et dsRNA-MiSeq ont fourni des lectures cartographiées sur le génome du virus. De plus, le flux de traitement Cent&Rec n'a pas permis de détecter le GEEV dans l'échantillon BIO-15-56S, suggérant que les résultats obtenus avec ce workflow doivent être considérés avec prudence. Étant donné que GEEV a été détecté exclusivement à l'aide du flux de travail DIA&MEG, une annotation BLAST a été effectuée sur les bases de données NCBI-nt et NCBI-nr pour garantir que les lectures attribuées à GEEV n'étaient pas de faux positifs. Les résultats de blast ont confirmé la présence de GEEV dans l'échantillon BIO-15-56S, correspondant aux résultats obtenus avec DIA&MEG.

Conclusion et points importants :

1. L'utilisation d'DsRNA comme matériau de départ est plus fiable, car elle est moins chère que l'ARN total pour la détection de virus et augmente les chances de diagnostic pour les virus à faible concentration.
2. La création d'un pipeline et d'un flux de traitement et d'analyse de données simple permet aux personnes inexpérimentées de détecter facilement les virus. L'article en lien avec cet objectif a été publié dans *Frontiers in evolutionary and genomic microbiology* (voir référence).
3. L'outil développé a pu être testé lors de la crise du virus de la mosaïque du concombre en 2022, il a servi à déterminer les agents causaux, notamment les virus de la mosaïque du concombre et des potyvirus. L'outil a été testé avec succès pour le concombre, le poivron, la tomate, le cantaloup, la citrouille, etc. pour un total de 12 cultures distinctes. L'outil a aussi permis de détecter pour la première fois au Canada deux virus nouvellement identifiés dans les cultures de solanacées, le virus "Altroemeria necrotic streak virus" et le "Spinach latent virus" chez la tomate. Ces premières détections et caractérisations génomiques ont fait l'objet de deux articles de première mention au Canada dans le journal "Plant Disease" et le journal "New Disease Report".
4. À la demande du LEDP, nous avons optimisé et simplifié le protocole de purification de dsRNA en réduisant le nombre d'étapes, tout en l'adaptant à différentes quantités de matériel de départ (2 g, 400 mg et 200 mg de feuilles). En fonction de la quantité de feuilles disponibles,

le LEDP dispose désormais de plusieurs stratégies permettant une purification rapide du dsRNA. Aussi, le pipeline bioinformatique a été aussi simplifié pour tenir compte de la nouvelle chimie du séquençage de nanopore et afin de permettre à un non-initié de pouvoir faire le traitement des données brute de séquençage par MinION. De plus, le pipeline bioinformatique a également été simplifié pour s'adapter à la nouvelle chimie de séquençage par nanopores. Cette amélioration permet aussi à un non-initié de traiter facilement les données brutes de séquençage générées par le MinION.

5. Des séances de formation théoriques et pratiques ont eu lieu, tant dans les installations d'AAC à Saint-Jean-sur-Richelieu que dans celles du LEDP à Québec, afin de garantir un transfert de technologie efficace. Bien que le projet touche à sa fin, il a été convenu avec le LEDP que le transfert et l'assistance se poursuivront aussi longtemps que nécessaire. Par ailleurs, d'autres séances de formation sont prévues durant l'hiver 2025.

II. Objective 2 : Déterminer le rôle des facteurs biotiques et abiotiques sur le développement des symptômes de viroses dans la vigne.

L'hypothèse de recherche est que l'apparition des symptômes sur les feuilles de vigne est induite par la nature du virome (composition et charge virale) et les conditions abiotiques (température, humidité relative, stress hydrique).

APERÇU DE LA MÉTHODOLOGIE

Essais au champ : Dans un premier temps, nous avons suivi pendant 2 ans (2021 et 2022) 120 plants de vigne asymptomatiques (60 de cépages rouges et 60 de cépages blancs), répartis dans deux vignobles présélectionnés. Les critères de sélection des plants étaient, l'absence de virose, la proximité d'un boisé, l'orientation par rapport au soleil, l'absence de dommages visuels d'insectes ou mécaniques. En utilisant l'outil développé dans l'objectif 1, le virome de chaque plant a été analysé deux fois par année (juillet, octobre) et les données d'évaluation visuelle des symptômes ainsi que les conditions abiotiques ont été colligées.

Dans un deuxième temps, nous avons sélectionné trois vignobles pour étudier la réponse physiologique de la vigne et de comprendre les facteurs déterminants pour l'expression des symptômes. Pour ce faire du matériel foliaire mature (limbe et pétiole) de 18 plants de vigne de trois cépages différents (Pinot noir, Vidal et Seyval blanc) a été collecté en deux temps, pour un total de 36 observations. Le premier moment d'échantillonnage était le 2 août (été) et le deuxième moment d'échantillonnage était le 30 septembre (automne). Quatre feuilles/plante (3 du bas et 1 du haut de la canopée) ont été récoltées et immédiatement congelées dans de l'azote liquide et stocké à -80°C jusqu'à une analyse plus approfondie. Toutes les plantes ont été inspectées visuellement pour des symptômes de virose, principalement des symptômes d'enroulement de la vigne et de pinot gris de la vigne. La méthode développée à l'objectif 1 a été utilisée pour déterminer et quantifier le virome. De plus, les mêmes échantillons ont été séquencés au Illumina NovaSeq (à Génome) pour déterminer le profil transcriptomique et suivre la réponse de la plante suite à une infection mixte. Le métabolome de ces plants a aussi été déterminé pour les deux temps d'échantillonnage.

Essai en chambre de croissance (Conviron) : Parallèlement aux essais de champs, nous avons mis en place une expérience en condition contrôlée. Des plants vignes certifiés exempt de virus par l'ACIA ont été divisés en deux groupes, un groupe de 10 plants infectés et un groupe de 5 plants contrôles non-infectés. Dans le Conviron, les plants de vigne sont soumis à deux régies de température, une régie de température constante de 21°C le jour 18 °C la nuit et une régie de température variable (variation de 18 à 35°C le jour, 18 à 22 °C la nuit). La durée totale de l'expérience est de 4 mois.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS

Pour l'essai de suivi des 120 plants dans différents vignobles, les résultats ont été peu concluants. En effet, le nombre de facteurs abiotiques considérés et la variabilité intra- et interannuelle ne permettent pas d'identifier les facteurs abiotiques qui gouvernent l'expression des symptômes. Cependant, l'essai de suivi de la réponse transcriptomique et métabolomique de la vigne ainsi que l'expression des symptômes dans trois vignobles a donné des résultats intéressants. En effet, nous avons examiné la prévalence des infections virales dans les plants de vigne au cours de deux périodes d'échantillonnage (été et automne) et évalué la modulation temporelle du virome de la vigne. Un total de 10 espèces virales et 2 viroïdes ont été détectés, y compris le virus associé à la mosaïque d'astéroïdes de la vigne (GAMaV), le virus de la marbrure de la vigne (GFKV) et le virus associé à l'enroulement de la vigne (GLRV), le virus du pinot gris de la vigne (GPGV), entre autres, avec des infections mixtes prévalentes dans la plupart des plants de vigne échantillonnés. La prédominance du virus associé au virus grapevine rupestris stem pitting (GRSPaV), du viroïde de la tache jaune de la vigne (GYSVd1), du virus du rabougrissement du houblon (HSVd) et du virus associé à l'enroulement 3 de la vigne (GLRV-3) dans les échantillons est conforme aux études précédentes, qui ont montré que le GRSPaV, le GYSVd1 et le HSVd sont communs dans la vigne (Beuve et al. 2018 ; Fall et al. 2020 ; Poojari et al. 2017 ; Xiao et al. 2018). Quels que soient les cultivars de vigne, un virome très diversifié a été détecté à la fois dans les plants asymptomatiques et symptomatiques et une grande majorité (83,33%) des plantes ont exprimé des symptômes de virose au cours de l'automne. Ceci est cohérent avec les études (Song et al. 2022; Weber 1993) qui ont montré que les symptômes de virose dans la vigne sont plus fréquents pendant la saison d'automne. De même, d'autres études (Naidu et al. 2015; Vondras et al. 2021) ont également observé des symptômes d'enroulement pendant la maturation des fruits ou la période post-véraison, qui se produit généralement pendant la saison d'automne en viticulture nordique. Cependant, nos résultats ont montré que dans 75 % des cas, l'abondance virale n'a pas augmenté ou diminué entre les deux temps de prélèvement (été et automne) même si 87,5 % des plantes symptomatiques ont exprimé des symptômes au cours de l'automne. De plus, il y avait un manque d'association entre l'abondance relative de GLRaV3 et de GPGV, qui sont connus pour provoquer des symptômes, et l'expression des symptômes. Ces résultats étaient inattendus, car il est admis dans la littérature scientifique que la charge virale est corrélée à l'expression des symptômes et que les vignes symptomatiques contiennent significativement plus de virus que les vignes asymptomatiques. En effet, des études antérieures ont démontré que les plants de vigne symptomatiques GLRaV3 et GPGV avaient une charge virale élevée de ces virus, tandis qu'une charge virale indétectable a été observée sur les plants de vigne asymptomatiques (Bertazzon et al. 2017 ; Monis et Bestwick 1996). Ce résultat a un impact majeur pour le diagnostic des virus de la vigne, car la capacité à détecter les virus par des méthodes conventionnelles (par exemple PCR, ELISA, etc.) est entravée par de faibles charges virales. Un autre facteur important qui peut expliquer le moment d'apparition des symptômes de viroses pourrait être la coinfection avec différents virus. Même si la plupart des virus et viroïdes détectés dans nos échantillons sont des membres du virome "de fond" (HSVd, GYSVd, GRSPaV etc.), qui ne sont pas connus pour causer des symptômes chez les cultivars utilisés dans notre étude, l'impact de ces virus en infection mixte est inconnu. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que le changement dans la composition du virome (espèces présentes), en particulier le virome de fond (background virome), entre nos deux temps d'échantillonnage peut expliquer la divergence dans le moment du symptôme. Cependant, les différents indices de diversité utilisés pour mesurer la similarité des communautés virales entre les deux temps d'échantillonnage ont montré qu'elles étaient très similaires en termes de richesse, de composition et d'abondance des espèces. Par conséquent, ni la charge virale, même pour les virus connus pour provoquer des symptômes (GLRaV3, GPGV), ni la modification de la composition du virome ne sont associées à l'expression des symptômes à l'automne. Même si nous n'avons pas évalué l'impact de la population de variantes des virus (haplotypes), en particulier pour GLRaV3 et GPGV, pour le même plant de vigne (intra-hôte),

l'occurrence de polymorphisme nucléotidique unique au sein de la même espèce virale au fil du temps peut expliquer le moment d'apparition des symptômes. En outre, l'expression des symptômes peut également être la conséquence d'un dysfonctionnement des feuilles et de l'accumulation de composés métaboliques en réponse à des infections virales, comme le montre le modèle récent proposé par Song et al. (Song et al. 2022).

Pour les essais en Conviron, il a été difficile d'infecter les plants de vigne en conditions contrôlées, en effet nous n'avons pas réussi à établir une population de vecteur suffisante et les infections mécaniques n'ont pas données les résultats escomptés. L'infection par greffage a pu fonctionner, mais après 6 mois et seulement pour quelques plants.

Plan de publication :

Au final ce projet donnera neuf publications scientifiques, quatre déjà publiées, un soumis et quatre autres qui seront soumis dans les prochaines semaines :

1. Javarán, V.J., Moffett, P., Lemoyne, P., Xu, D., AdkarPurushothama, C. and *Fall, M. L. 2021. Grapevine virology in the third-generation sequencing era: From virus detection to viral epitranscriptomics. **Plants**. <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/11/2355>
2. Lussier-Lépine, M., Lemoyne, P., Xu, D., Dionne, A., Javarán, V.J., *Fall, M. L. 2023. First report of Alstroemeria necrotic streak virus infecting greenhouse bell pepper (*Capsicum annuum*) in Canada. **Plant Disease**. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-23-0155-PDN>
3. Javarán, V.J., Poursalavati, A., Lemoyne, P., T.Ste-Croix, D., Moffett, P. and *Fall, M.L. 2023. Nanopore Sequencing of Double-Stranded RNA (dsRNA) for Plant Virus and Viroid Detection. **Frontiers in evolutionary and genomic microbiology**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1192781>
4. Javarán, V. J., Poursalavati, A., Lemoyne, P., Vivancos, J., and Fall, M.L. 2024. First detection and genomic characterisation of Spinach latent virus in tomato in Canada Integrated. **NEW DISEASE REPORT**. <https://doi.org/10.1002/ndr2.12249>
5. Fall, M.L., Poursalavati, A., Sidibé, A., Javarán, V.J., Silva Martins, G., Xu, D., Lemoyne, P., Moffett, P. 2025. Integrated multiomics profiling of grapevine in response to viral mixed infection. **PhytoFrontiers** (soumis).
6. Javarán, V. J., Lemoyne, P., Xu, D., Ste-Croix, D. T., Moffett, P., & Fall, M. L. Grapevine red blotch virus is packaged in host exosomes to overcome epigenetic silencing of coat protein expression. (en préparation).
7. Javarán, V. J., Lemoyne, P., Lussier-Lépine, M., Xu, D., Moffett, P., & Fall, M. L. Evaluation and genetic diversity analysis of Bell pepper endornavirus in Quebec using hybrid assembly approaches. (en préparation).
8. Javarán, V. J., Lemoyne, P., Poursalavati, A., Lussier-Lépine, M., Robert, É., Ste-Croix, D. T., Moffett, P., & Fall, M. L. NanoViromics V2: Enhanced dsRNA extraction and simplified data analysis pipeline for rapid plant virus and viroid detection by nanopore sequencing. (en préparation).
9. Javarán, V. J., Sajaditabar, R., Lemoyne, P., Xu, D., Mahmoud, S., & Fall, M. L. Unveiling a New Cryptic Virus from Lavender samples via Nanopore dsRNA Sequencing. (en préparation).

REFERENCE

- Beuve, M., et al. (2018), 'A complex virome unveiled by deep sequencing analysis of RNAs from a French Pinot Noir grapevine exhibiting strong leafroll symptoms', *Arch Virol*, 163 (11), 2937-46.
- Bertazzon, N., et al. (2017), 'Association between genetic variability and titre of Grapevine Pinot gris virus with disease symptoms', *Plant Pathology*, 66 (6), 949-59.
- Daly GM, Leggett RM, Rowe W, Stubbs S, Wilkinson M, Ramirez-Gonzalez RH, et al. Host Subtraction, Filtering and Assembly Validations for Novel Viral Discovery Using Next Generation Sequencing Data. *PLOS ONE*. 2015;10(6):e0129059.
- Fall, Mamadou L., Dong Xu, Pierre Lemoyne, Issam E. Ben Moussa, Carole Beaulieu, and Odile Carisse. "A Diverse Virome of Leafroll-Infected Grapevine Unveiled by dsRNA Sequencing." *Viruses* 12, no. 10 (2020): 1142.
- Kim D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. 2016;26(12):1721–9
- Miller JR, Koren S, Dille KA, Puri V, Brown DM, Harkins DM, et al. Analysis of the *Aedes albopictus* C6/36 genome provides insight into cell line utility for viral propagation. *GigaScience*. 2018;7(3).
- Martí Jm. Recentrifuge: Robust comparative analysis and contamination removal for metagenomics. *PLOS Computational Biology*. 2019;15(4):e1006967
- Monis, J. and Bestwick, R.K. (1996), 'Detection and Localization of Grapevine Leafroll Associated Closteroviruses in Greenhouse and Tissue Culture Grown Plants'.
- Naidu, R. A., Maree, H. J., and Burger, J. T. (2015), 'Grapevine leafroll disease and associated viruses: a unique pathosystem', *Annu Rev Phytopathol*, 53, 613-34.
- Poojari, S., et al. (2017), 'Epidemiology and Genetic Diversity of Grapevine Leafroll-Associated Viruses in British Columbia', *Plant Dis*, 101 (12), 2088-97.
- Song et al. (2022), 'Transcriptomic Analyses of Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 Infection in Leaves and Berries of 'Cabernet Franc'', *Viruses*, 14 (8).
- Vondras, A. M., et al. (2021), 'Rootstock influences the effect of grapevine leafroll-associated viruses on berry development and metabolism via abscisic acid signalling', *Mol Plant Pathol*, 22 (8), 984-1005
- Weber, E.; Golino, D. A.; Rowhani A. (1993), 'Leafroll disease of grapevines', *Pract. Wine. Vineyard*, 4, 4, 21–24.
- Watts GS, Thornton JE, Jr., Youens-Clark K, Ponsero AJ, Slepian MJ, Menashi E, et al. Identification and quantitation of clinically relevant microbes in patient samples: Comparison of three k-mer based classifiers for speed, accuracy, and sensitivity. *PLOS Computational Biology*. 2019;15(11):e1006863.
- Xiao, H., et al. (2018), 'Survey for major viruses in commercial *Vitis vinifera* wine grapes in Ontario', *Virol J*, 15 (1), 127.

ANNEXES:

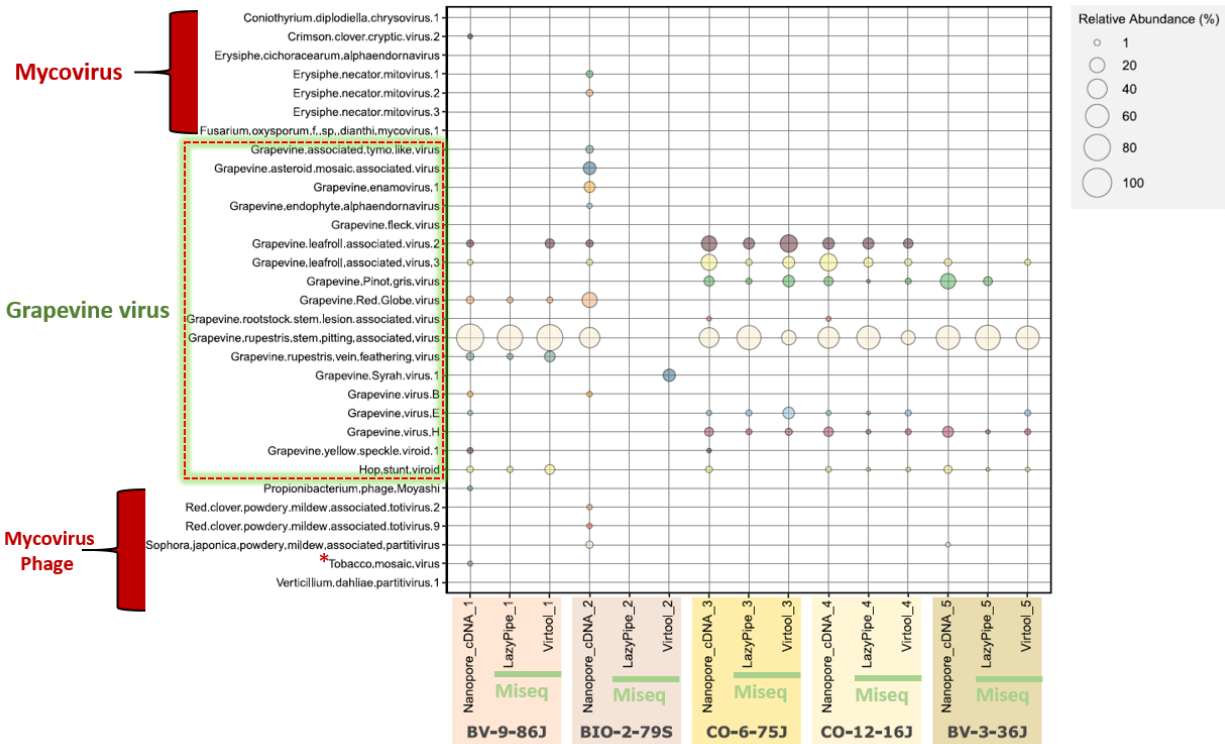


Figure 1. Comparaison des résultats du séquençage Nanopore et du séquençage Miseq pour la détection des virus de la vigne. Pour le séquençage direct d'ADNc et le séquençage Miseq, deux bibliothèques différentes ont été préparées après extraction d'DsRNA à partir d'échantillons infectés. Pour analyser les lectures courtes après le prétraitement et le découpage, deux pipelines ont été utilisés, LazyPipe et Virtool. L'analyse des lectures de séquençage Nanopore a nécessité plusieurs étapes, dont l'extraction des virus au moyen de BLAST, suivie de mesures semi-quantitatives dans Excel et Python.

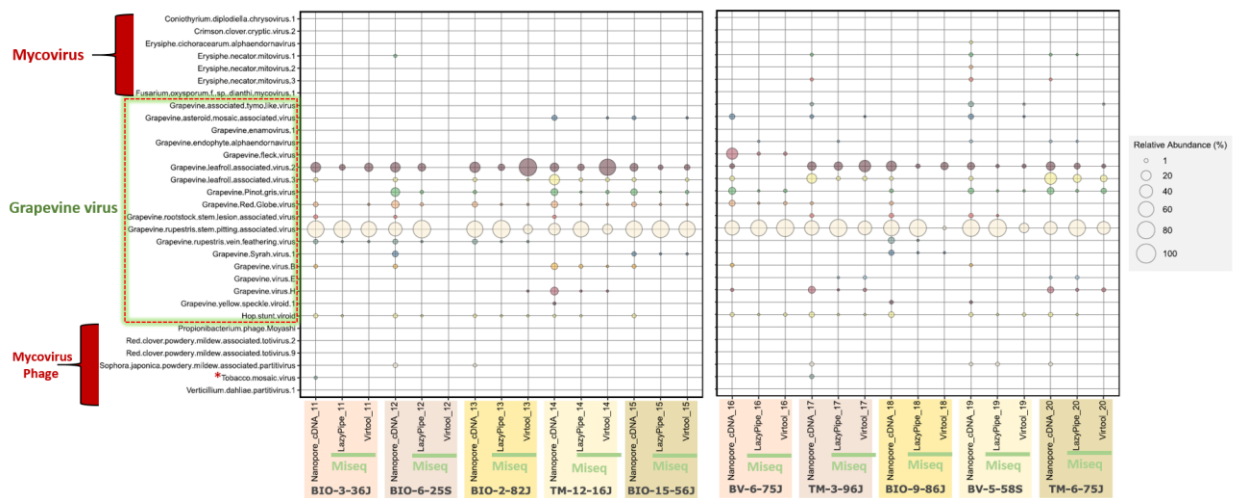


Figure 2. Comparaison des résultats du séquençage Nanopore et du séquençage Miseq pour la détection des virus de la vigne. Pour le séquençage direct d'ADNc et le séquençage Miseq, deux

bibliothèques différentes ont été préparées après extraction d'DsRNA à partir d'échantillons infectés. Pour analyser les lectures courtes après le prétraitement et le découpage, deux pipelines ont été utilisés, LazyPipe et Virtool. L'analyse des lectures de séquençage Nanopore a nécessité plusieurs étapes, dont l'extraction des virus au moyen de BLAST, suivie de mesures semi-quantitatives dans Excel et Python.

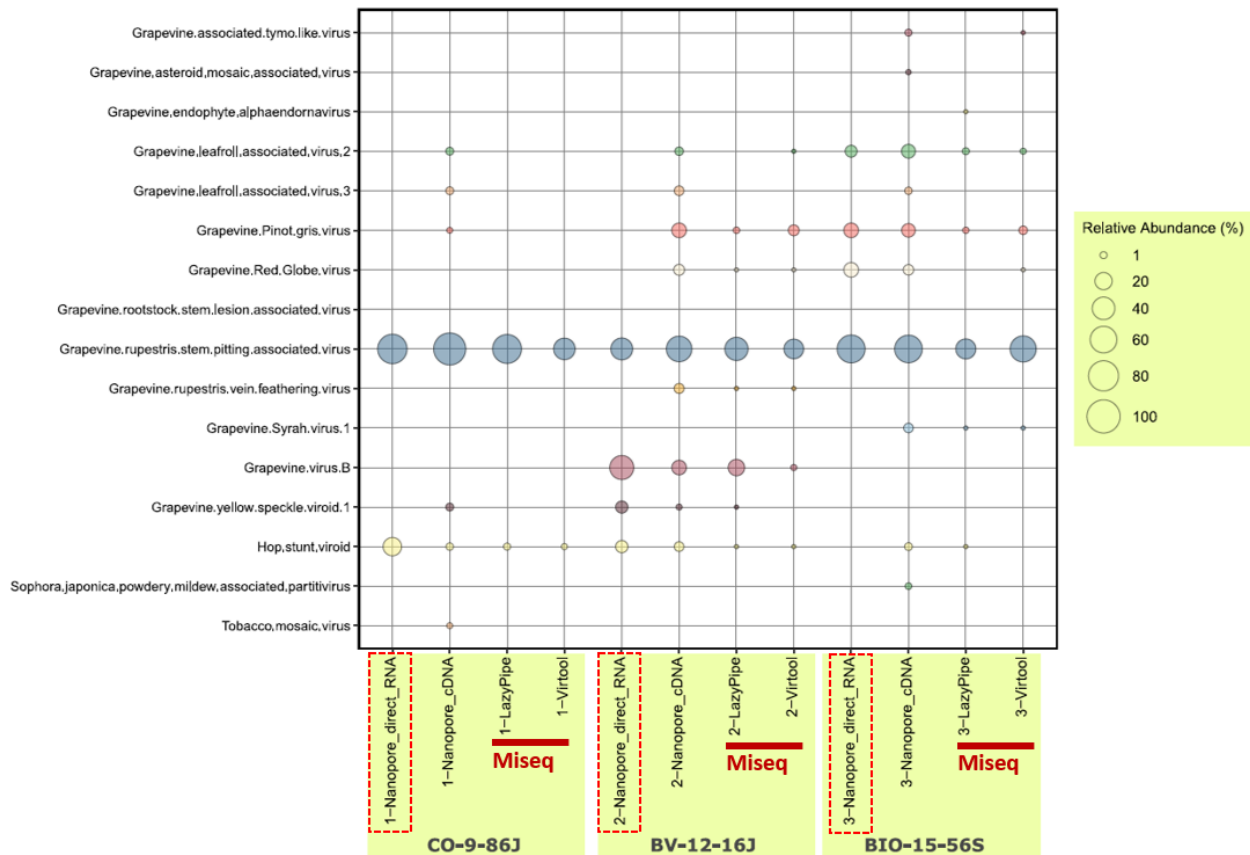


Figure 3. Comparaison des résultats du séquençage Nanopore (séquençage direct ARN et ADNc direct) et du séquençage Miseq pour la détection des virus de la vigne. Pour le séquençage direct d'ADNc et le séquençage Miseq, deux bibliothèques différentes ont été préparées après extraction d'DsRNA à partir d'échantillons infectés. Pour effectuer le séquençage direct de l'ARN, les ARNr ont été détachés par le QIAseq FastSelect –rRNA Plant Kit après extraction de l'ARN total. Pour conserver tous les ARN viraux dans nos bibliothèques, l'ARN restant a été polyadénylé par la polymérase E. coli Poly A. Nos adaptateurs personnalisés ont ensuite été utilisés pour générer les bibliothèques. Pour analyser les lectures courtes après le prétraitement et le découpage, deux pipelines ont été utilisés, LazyPipe et Virtool. L'analyse des lectures de séquençage Nanopore a nécessité plusieurs étapes, dont l'extraction des virus au moyen de BLAST, suivie de mesures semi-quantitatives dans Excel et Python.

Tableau 1. Coût de séquençage direct de l'ARN total

Étape principale	Étapes	Matériel	1 Échantillon	4 Échantillons	30 Échantillons
Synthèse du premier brin d'ADN	Ligation de l'adaptateur RT	NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer	10 centimes	40 centimes	3 \$
		T4 DNA Ligase	3,5 \$	14 \$	105 \$
		Adaptateur RT	(fourni pour 6 échantillons par le kit)	1,8 \$ (45 centimes/échantillon)	13,5 \$
	Transcription inverse	dNTPs	85 centimes	3,4 \$	25,5 \$
		SuperScript III reverse transcriptase	6,28 \$	25,12 \$	188,4 \$
Point clé : Après cette étape, les échantillons seront regroupés.					
Préparation de la bibliothèque	Ligation de l'adaptateur de séquençage	NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer	30 centimes	30 centimes	30 centimes
		T4 DNA Ligase	7 \$	7 \$	7 \$
		Adaptateur ARN (RMX)	(fourni pour 6 bibliothèques par le kit)	(fourni pour 6 bibliothèques par le kit)	(fourni pour 6 bibliothèques par le kit)
Séquençage	Amorçage et chargement sur flow cell	Flow cell	900 \$	900 \$	900 \$
		Composés chimiques du kit	100 \$	100 \$	100 \$
		Coût total/séquençage	1 018,03 \$	1 052,02 \$	1 342,70 \$
		Prix total/échantillon	1 018,03 \$	263 \$	44,8 \$

Tableau 2. Coût de séquençage de cDNA issu de l'extraction d'ARN doubles brins.

Étape principale	Étapes	Amorces aléatoires + codes-barres commerciaux			Codes-barres personnalisés		
		Matériel	1 Échantillon	23 Échantillons	Matériel	24 Échantillons (Custom-Barcodes)	96 Échantillons (Custom-Barcodes)
Synthèse du double brin d'ADNc	Premier brin	Mélange d'amorces aléatoires	2,7 \$	62,1 \$	Amorce personnalisée	2,9 \$	11,5 \$
		dNTPs	42 centimes	9,66 \$	dNTPs	10 \$	40,3 \$
		Inhibiteur de ribonucléase RNasin®	2,8 \$	64,4 \$	Inhibiteur de ribonucléase RNasin®	67,2 \$	269 \$
		Maxima H minus	5 \$	115 \$	Amorce de commutation de brin	20,4 \$	82 \$
					Maxima H minus	120 \$	480 \$
	Deuxième brin	RNase H	1,5 \$	34,5 \$	Enzyme RNase Cocktail™	43,2 \$	172,8 \$
					Point clé : Après cette étape, les échantillons seront regroupés.		
		dNTPs	42 centimes	9,66 \$	Amorce PR2	85 centimes	85 centimes
		Klenow	1,7 \$	39 \$	2x LongAmp Taq Master Mix	2 \$	2 \$
		E. coli DNA Ligase	3,74 \$	86 \$			
Préparation de la bibliothèque	Préparation finale	NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module	20 \$	460 \$	-	20 \$	20 \$

	Ligation de codes-barres	Code-barres natif	-	190 \$	-	-	-
		Blunt/TA Ligase Master Mix	-	271,5 \$	-	-	-
		Point clé : Après cette étape, les échantillons seront regroupés.					
	Ligation de l'adaptateur	NEBNext® Quick Ligation Module	38 \$	38 \$	-	38 \$	38 \$
Séquençage	Amorçage et chargement sur flow cell	Flow cell	900 \$	900 \$	-	900 \$	900 \$
		Kit produits chimiques	100 \$	100 \$	-	100 \$	100 \$
		Coût total/séquençage	1 077 \$	2 380 \$	-	1 324 \$	2 116 \$
		Prix total/échantillon	1 077 \$	103 \$	-	55 \$	22 \$

BLIBLIOGRAPHIE :

- Almeida, R., Daane, K., Bell, V., Blaisdell, G. K., Cooper, M., Herrbach, E., and Pietersen, G. (2013). Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in Microbiology*. 4, 94.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., and Rowhani, A. (2009). Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*. 387, 395–401.
- Boykin, Laura M., Peter Sseruwagi, Titus Alicai, Elijah Ateka, Ibrahim Umar Mohammed, Jo-Ann L. Stanton, Charles Kayuki et al. "Tree Lab: Portable genomics for early detection of plant viruses and pests in Sub-Saharan Africa." *Genes* 10, no. 9 (2019): 632.
- Bronzato Badial, Aline, Diana Sherman, Andrew Stone, Anagha Gopakumar, Victoria Wilson, William Schneider, and Jonas King. "Nanopore sequencing as a surveillance tool for plant pathogens in plant and insect tissues." *Plant disease* 102, no. 8 (2018): 1648-1652.
- Chalupowicz, L., A. Dombrovsky, V. Gaba, N. Luria, M. Reuven, A. Beerman, O. Lachman, O. Dror, G. Nissan, and S. Manulis-Sasson. "Diagnosis of plant diseases using the Nanopore sequencing platform." *Plant Pathology* 68, no. 2 (2019): 229-238.
- Della Bartola, Michele, Stephen Byrne, and Ewen Mullins. "Characterization of potato virus Y isolates and assessment of nanopore sequencing to detect and genotype potato viruses." *Viruses* 12, no. 4 (2020): 478.
- Fall, Mamadou L., Dong Xu, Pierre Lemoyne, Issam E. Ben Moussa, Carole Beaulieu, and Odile Carisse. "A Diverse Virome of Leafroll-Infected Grapevine Unveiled by dsRNA Sequencing." *Viruses* 12, no. 10 (2020): 1142.
- Fellers, John P., Christian Webb, Madison C. Fellers, Jessica Shoup Rupp, and Erick De Wolf. "Wheat virus identification within infected tissue using nanopore sequencing technology." *Plant disease* 103, no. 9 (2019): 2199-2203.
- Filloux, Denis, Emmanuel Fernandez, Etienne Loire, Lisa Claude, Serge Galzi, Thierry Candresse, Stephan Winter et al. "Nanopore-based detection and characterization of yam viruses." *Scientific reports* 8, no. 1 (2018): 1-11.
- Fuchs, Marc. "Grapevine viruses: A multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard." *Journal of Plant Pathology* 102 (2020): 643-653.
- Fuchs, M. Grapevine viruses. 2020. A multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *J. Plant Pathol.* 2020, 102, 643–653.
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., Terlizzi, F., Credi, R., and Saldarelli, P. (2012). A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in cv pinot gris. *Virus Res.* 163, 262–268.
- Gagné, F. 2017. Encépagement des membres du conseil des vins du Québec. Édition 2017, conseil des vins du Québec, vinsduquebec.ca.
- Kesanakurti, Prasad, Mark Belton, Hanaa Saeed, Heidi Rast, Ian Boyes, and Michael Rott. "Screening for plant viruses by next generation sequencing using a modified double strand RNA extraction protocol with an internal amplification control." *Journal of virological methods* 236 (2016): 35-40.
- Meng, B., Martelli, G. P., Golino, D. A., and Fuchs, M. (Eds.). (2017). *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*. Springer International Publishing.

Mackenzie, D.J., Johnson, R.C., Warner, C., 1996. Incidence of four important viral pathogens in Canadian vineyards. *Plant Dis.* 80:955–958

Naito, Fernanda YB, Fernando L. Melo, Maria Esther N. Fonseca, Carlos AF Santos, Carolina R. Chanes, Bergmann M. Ribeiro, Robert L. Gilbertson, Leonardo S. Boiteux, and Rita de Cássia Pereira-Carvalho. "Nanopore sequencing of a novel bipartite New World begomovirus infecting cowpea." *Archives of virology* 164, no. 7 (2019): 1907-1910.

Stenger, Drake C., Lindsey P. Burbank, Renyuan Wang, Alexander A. Stewart, Caleb Mathias, and Michael M. Goodin. "Lost and found: rediscovery and genomic characterization of sowthistle yellow vein virus after a 30+ year hiatus." *Virus research* 284 (2020): 197987.

Sharma AM, Baraff B, Hutchins JT, Wong MK, Blaisdell GK, Cooper ML, et al. .2015. Relative Prevalence of Grapevine Leafroll-Associated Virus Species in Wine Grape-Growing Regions of California. *PLoS ONE* 10(11): e0142120.

Thompson, B.D.; Dahan, J.; Lee, J.; Martin, R.R.; Karasev, A.V. A Novel Genetic Variant of Grapevine leafroll-associated virus-3 (GLRaV-3) from Idaho Grapevines. *Plant Dis.* 2019, 103, 509–518.

Wallingford, A. K., Fuchs, M. F., Martinson, T., Hesler, S., and Loeb, G. M. (2015). Slowing the spread of grapevine leafroll-associated viruses in commercial vineyards with insecticide control of the vector, *Pseudococcus maritimus* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of insect science.* 15(1), 112.