

## 포도 조직배양에 의한 Grapevine Leafroll-associated

### 3 Closterovirus의 증식과 검출효율 증대

김현란\* · 정재동<sup>1</sup> · 정봉남 · 이봉춘<sup>2</sup> · 박진우<sup>3</sup> · 최용문  
원예연구소, <sup>1</sup>경북대학교, <sup>2</sup>영남농업시험장, <sup>3</sup>농업과학기술원

## Improved Detection and Purification of Grapevine Leafroll-associated 3 Closterovirus Using Tissue Culture

KIM, Hyun Ran\* · CHUNG, Jae Dong<sup>1</sup> · CHUNG, Bong Nam · LEE, Bong Choon<sup>2</sup> · PARK, Jin Woo<sup>3</sup> · CHOI, Yong Mun  
*Horticultural environment Division, National Horticultural Research Institute, Rural Development Administration (RDA),  
Suwon, 441-440, Korea*

<sup>1</sup>*College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea*

<sup>2</sup>*National Yeongnam Agricultural Experiment Station, 1085, Milyang, 627-803, Korea*

<sup>3</sup>*Plant Pathology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, 441-707, Korea*

**ABSTRACT** Grapevine leafroll-associated 3 closterovirus (GLRaV-3) is phloem limited virus, and one of the most severe viral diseases found in Korea. However, nonhomogenous distribution and low concentration and seasonal variations of GLRaV-3 in grapevines remain as main problems which prevent the introduction and molecular biology or serology experiments. Virus-infected plantlet in vitro was obtained from node tissue cuttings, which was GLRaV-3 infected 'kyoho' vines. The amount of purified virus was highest in vitro plantlet. Moreover, viruses seem to be relatively homogeneously distributed in all organs including leaf, stem and callus derived from in vitro plantlets. RT-PCR detection using in vitro plantlet tissue as template was most effective. When comparing ELISA to RT-PCR, RT-PCR detection was 1,000 times as effective as ELISA. These results can be explained by improved quality such as tenderness or less tannins in plantlet in vitro. In conclusion, until infected herbaceous host will be available, tissue culture can be usefully adopted as a technique for a good source of GLRaV-3 closterovirus for further studies.

**Key words:** GLRaV-3, in vitro plantlet, detection, purification, grapevine

## 서 론

포도에 발생하고 있는 주요 바이러스병으로는 전 세계적으로 grapevine fanleaf virus 등 약 44종 (5과 16속)이 보고되어 있으며 (Martelli and Walter 1998), 이러한 바이러스들은 생장을 약화시키고 과실수량 및 당도감소, 착색불량으로 과실 품질을 저하시키는 것으로 알려져 있다 (Yamakawa et al.

1982; Yamakawa and Moriya 1983; Mitsuo 1987; Jang 1991). 포도 바이러스병 중에 특히 잎말림바이러스병 (leafroll)은 40% 이상의 수량 손실을 가져오며 (Goheen 1970; Woodham et al. 1984) 전 세계적으로 널리 분포하고 있는데 이 병의 원인에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않지만 phloem에 국부적으로 존재하는 7종의 바이러스들이 단독 혹은 복합감염되어 발생하는 것으로 추정되고 있다 (Gugerli et al. 1984; Gugerli et al. 1990; Zimmermann et al. 1990; Bosica et al. 1995; Choueiri et al. 1996). Gugerli 등 (1984)이 처음으로 포도 grapevine

\*Corresponding author. Tel 031-290-6221 Fax 031-295-9548  
E-mail kimhr0@rda.go.kr

leafroll associated virus (GLRaV) 이병주로부터 *closterovirus* 유사입자를 분리하였으며, Hu 등 (1990)에 의해 바이러스 순화효율 향상을 위한 개선된 방법들이 제시되기도 하였으나, 다른 바이러스들에 비해 분리되는 바이러스 양이 극히 적을 뿐 아니라 목본성 조직에 많은 억제물질 등에 의해 순수분리가 매우 어려운 것으로 보고되어 있다. Grapevine leafroll-associated 3 *Closterovirus* (GLRaV-3)는 single-strand RNA 바이러스이며 flexible filamentous type으로 하나 또는 두 가지 형태의 단백질 subunit로 둘러싸여 있다 (Agranovsky 1995; Candresse & Martelli 1995). 이 바이러스는 현재까지 초본 기주작물이 보고되어 있지 않아 바이러스 증식 및 관련 특성 실험에 많은 어려움이 있었으며, 포도나무에서도 발아기 신엽조직에서보다 생육 후반기의 완전히 전개된 성엽조직에서 병징이 뚜렷히 나타나는 등 시기적 제한성을 가지고 있어 다루기 힘든 바이러스였다. 본 실험은 이러한 시기적 제한성, 목본성 기주작물이라는 단점 등을 극복하기 위하여 조직배양 기술을 이용하여 기내에 바이러스 이병주를 배양, 증식함으로써 바이러스의 증식·순화효율 및 검출효율의 향상을 위해 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 바이러스 감염주에서 조직배양묘 양성

ELISA로 검출된 GLRaV-3 이병주로부터 신초를 채취하여 1% NaOCl 용액으로 5분간 살균한 다음 멸균수로 3회 수세한 후 약 1cm 길이로 신초의 줄기를 잘라서 조제하였다. 배양배지는 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지를 사용하여 BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NAA  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 첨가한 배지에 조제한 줄기를 치상하여 direct shooting을 유기함으로써 기내 조직배양묘(in vitro plantlet)를 양성하였다.

### ELISA

배양묘는 30일 간격으로 계대배양하여 증식시키면서 배양 횟수에 따른 기내 조직배양묘의 바이러스 농도변화와 배양묘의 잎, 줄기와 줄기유래의 callus 조직 등 조직 부위별로 바이러스 검출 여부도 ELISA로 조사하였다. 스위스 BIOREBA 사로부터 IgG와 alkaline phosphatase가 결합된 conjugated-IgG를 구입하여 ELISA 진단에 사용하였다. 시료는 Tris-HCl buffer를 10배량 (w/v) 첨가, 마쇄하여 즙액을 추출하였다. GLRaV-3 IgG를 coating buffer ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaN}_3$ , pH9.6)에 1,000배 농도 ( $1 \mu\text{L}/\text{mL}$ )로 희석하였다. 희석한 IgG  $200 \mu\text{L}$ 씩을 microplate의 well에 넣어  $30^\circ\text{C}$ 에서 4시간 동안 incubation 하였다. Coating액은 버리고 PBS-T (phosphate buffered saline, 0.5% Tween-20) 세척용액으로 well을 3회

이상 세척한 후 추출즙액을 well에  $200 \mu\text{L}$ 씩 넣고  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight 시켰다. PBS-T용액으로 well을 깨끗이 세척한 후 conjugate buffer (2% polyvinylpyrrolidone, 0.05% Tween-20, 0.2% bovine serum albumin)에 1,000배 농도로 희석한 conjugate IgG를  $200 \mu\text{L}$ 씩 넣어  $30^\circ\text{C}$ 에서 5시간 동안 incubation 하였다. PBS-T 용액으로 세척한 다음 substrate buffer (Diethanolamine,  $\text{NaN}_3$ )에 pNPP (p-nitrophenyl-phosphate)를  $1 \text{ mg}/\text{mL}$ 로 넣어 암상태에서 완전히 녹였다. 이 용액을 well당  $200 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 암상태에서 30분~1시간 incubation한 후 ELISA reader (Molecular device Co.)로  $405 \text{ nm}$ 에서의 흡광도를 측정하였다.

### RT-PCR

RNA 추출은 Qiagen RNeasy Plant mini kit를 사용하여 포장 재배주의 잎, 엽병+중륜조직 및 기내 배양묘의 줄기+잎 조직으로부터 Total RNA를 추출하였으며, Genbank (NCBI)를 검색하여 기 보고되어 있는 GLRaV-3의 염기서열을 기준으로 외피단백질유전자 부위를 증폭할 수 있도록 각각 25개의 염기로 primer를 작성하였다 (Table 1).

Promega사의 Access RT-PCR system kit를 사용하여  $5 \mu\text{L}$ 의 template RNA를  $0.5 \text{ mL}$  tube에 넣고 AMV Reverse Transcriptase [0.1 M potassium phosphate (pH7.2), 0.2% Triton X-100, 2 mM DTT and 50% glycerol] 5 unit/ $\mu\text{L}$ , *Tfl* DNA Polymerase [50% glycerol, 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM dithiothreitol (DTT), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P40 and 0.5% Tween 20] 5 unit/ $\mu\text{L}$ , AMV/*Tfl* 5X reaction buffer  $10 \mu\text{L}$ , 10 mM dNTP mix  $1 \mu\text{L}$ , 25 mM  $\text{MgSO}_4$   $2 \mu\text{L}$ , 33 pmole 농도의 upstream primer (P1), downstream primer (P2) 각각  $1 \mu\text{L}$ 씩 넣은 RT-PCR mix를 tube에 첨가한 다음 RNase-free water를 tube당  $28 \mu\text{L}$ 를 넣어 반응액이 총  $50 \mu\text{L}$ 가 되도록 하였다. RT-PCR 반응은 BIOMETRA사의 UNO II 모델을 사용하여 먼저  $48^\circ\text{C}$ 에서 45분간 역전사 반응을 시킨 다음  $94^\circ\text{C}$ 에서 2분간 pre-denature 후 40 cycle로  $94^\circ\text{C}$ 에서 30초간 denaturation,  $60^\circ\text{C}$ 에서 1분간 annealing,  $68^\circ\text{C}$ 에서 2분간 elongation시키고  $68^\circ\text{C}$ 에서 7분간 최종 반응시킨 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 보존하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel과 0.5X TAE buffer (40 mM Tris acetate, 2 mM EDTA)를 사용하여 100V에서 전기영동한 후 Ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator에서 밴드를 관찰하였다.

**Table 1.** Oligonucleotide primers used for RT-PCR.

Primer	Size (nt)	Sequences
P1	25	5' GCGGATCCATGGCATTGAACTGAA3'
P2	25	5' CTACTTCTTTTGCAATAGTTGGAAG3'

RT-PCR과 ELISA 비교

2가지 방법의 검정 효율을 비교하기 위하여 GLRaV-3이 감염된 기내 배양묘의 잎 조직을 사용하여 각각 ELISA와 RT-PCR을 실시하였다. 기내 배양묘의 잎조직 100 mg에서 전체 RNA를 추출하여 50 µL에 녹인 다음 5 µL의 RNA를 template로 하여 10배수로 희석하여 RT-PCR을 수행하였고 ELISA의 경우에도 100 mg의 잎조직을 10배 양의 Tris-HCl 완충액으로 즙액을 추출하여 10배수로 희석하여 검정한계를 비교하였다.

바이러스 정제 및 입자 관찰

바이러스 정제는 기내 배양묘의 잎, 줄기 등 전 조직과 포장 재배주의 이병엽, 엽병과 엽맥 등 사부조직을 바이러스 정제에 사용하였으며 포장 재배주의 시료는 잎이 적색으로 변하는 병징 발현초기에 채취하였다. 바이러스 정제방법은 Hu 등 (1990)과 Bar-Joseph 등의 방법 (1985)을 다소 변형시킨 방법을 사용하였다. 병징을 나타내는 잎 80 g과 기내 배양묘의 잎, 줄기, 껍질을 포함한 전 식물체 조직 40 g을 액체질소로 마쇄하여 저속 및 고속 원심 분리를 반복하여 바이러스를 부분 순화한 후 CS<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sucrose density gradient (Bar-Joseph 등 1985; Hu 등 1990)에서 형성된 우윳빛 band를 취한 후 농축하여 정제된 바이러스를 얻었다. 정제 바이러스는 Carl zeiss 906E 투과전자현미경 (TEM)을 사용하여 입자를 관찰하였으며, 기내 배양묘의 잎과 포장의 병징발현된 잎을 대상으로 dip법에 의해 입자를 관찰하였다.

결과 및 고찰

ELISA

바이러스 감염주의 신초를 기내 배양하여 양성된 기내 배양묘를 30일 간격으로 계대배양하여 증식시키면서 배양 횟수에 따른 바이러스 농도변화를 ELISA로 조사한 결과, 바이러스 농도는 계속 고농도로 유지되고 있었다 (Table 2). 그리고 잎, 줄기 및 줄기 유래의 callus 조직에서 모두 고농도의 바이러스가 검출되어 기내식물체의 분화와 더불어 바이러스도 증식함을 확인할 수 있었다 (Table 3). 위의 결과는 Price 등 (1996)이 원형질체에서의 *Citrus tatter leaf virus* (CTLV)의 복제를 최초로 보고한 결과와 마찬가지로 미분화조직인 줄기 유래의 callus 조직에서도 바이러스가 복제되고 있음을 알 수 있었다.

Table 2. Concentration of GLRaV-3 by ELISA at each subculture time on grapevine plantlet obtained from in vitro node culture of mother plant, which was infected with GLRaV-3.

Isolates	Absorbance at 405 nm <sup>y</sup>		
	1st <sup>x</sup>	2nd	3rd
G3-K-K1	0.485	0.578	0.816
G3-I-N1	1.118	2.125	2.512

<sup>x</sup>Subculture was carried out every 30 days, respectively.

<sup>y</sup>Healthy control value was 0.020.

Table 3. Virus detection by ELISA in leaf, stem and callus of plantlet obtained from in vitro node culture of mother plant, which was infected with GLRaV-3.

Parts	Absorbance at 405 nm <sup>x</sup>	
	G3-K-K1 isolate	G3-I-N1 isolate
Leaf	1.356	0.921
Stem	0.734	1.257
Callus	0.623	1.025

<sup>x</sup>Healthy control value was 0.012.

RT-PCR

RT-PCR 진단에서 포장 재배주의 어린 잎조직에서는 바이러스 농도가 너무 낮아 검출되지 않았지만 포장재배주의 엽병과 중륜조직 및 기내 배양묘에서는 약 942 bp 정도의 GLRaV-3 외피단백질유전자 크기의 특이 밴드가 나타났고 특히 기내 배양묘 조직에서 검출이 가장 용이하였다 (Figure 1). 기내 배양묘에서 추출한 RNA를 각 1~9 µL씩을 주형으로 사용하여 RT-PCR 하였을 때 1 µL의 적은 양으로도 뚜렷한 밴드가 검출되어 기내 배양묘의 viral RNA 농도가 충분히 높고 PCR 반응을 저해하는 요소들이 적어 양질의 RNA가

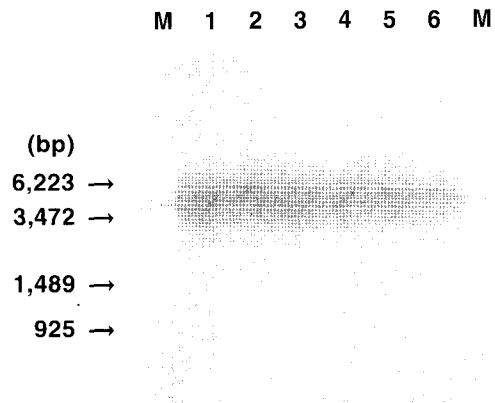
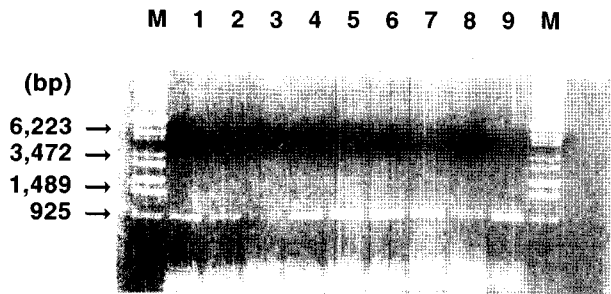


Figure 1. Agarose gel electrophoretic analysis of cDNA products from RT-PCR of GLRaV-3 infected grapevine tissues. M : Size marker (λDNA/Sty I), Lane 1~3 : 1 step RT-PCR (Used Promega Kit). Lane 1) young leaf, Lane 2) petiole and midrib, Lane 3) in vitro infected plantlet.



**Figure 2.** Agarose gel electrophoretic analysis of RT-PCR products by different amounts of template RNA extracted from *in vitro* plantlet. M, Size marker ( $\lambda$ DNA/Sty I); Lane 1~9, 1  $\mu$ L to 9  $\mu$ L total RNA, respectively.

분리되었음을 알 수 있었다 (Figure 2).

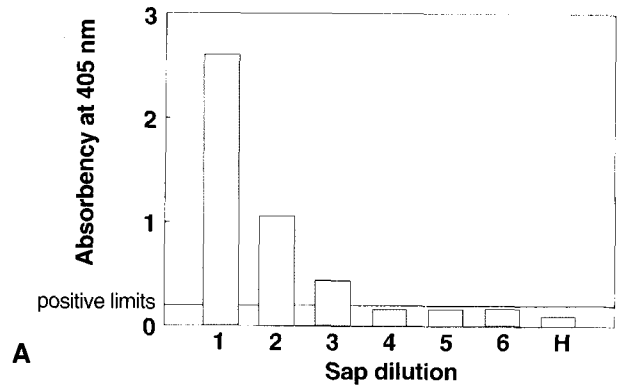
**ELISA와 RT-PCR 비교**

또한 기내 배양묘를 이용해 RT-PCR과 ELISA법의 바이러스 검출감도를 비교한 결과, ELISA의 경우  $10^{-3}$ 으로 희석하였을 때까지 검출이 가능하였으며  $10^{-4}$ 부터는 건전대조구에 비해서는 다소 높은 흡광도를 보였으나 양성반응으로 볼 수는 없었다. 그렇지만 RT-PCR의 경우 아주 미약하지만  $10^{-6}$ 까지 검출이 가능하여 ELISA법에 비해 1,000배 정도 검출감도가 높은 것으로 나타났다 (Figure 3). Minafra 등 (1992)이 포도에서 Grapevine virus A RNA의 검출한계가 RT-PCR법이 ELISA나 분자교잡법에 비해 200배 정도로 높았다고 보고한 데 반해 본 실험의 결과가 5배 정도로 큰 차이를 나타낸 것은 바이러스 검출이 용이한 기내 배양묘를 이용하였기 때문인 것으로 생각된다.

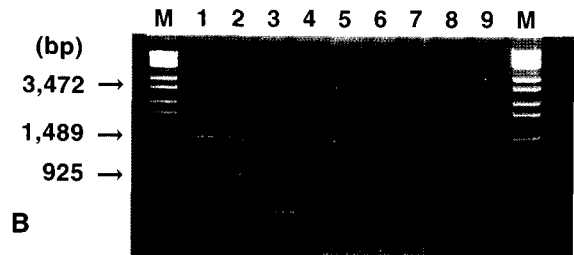
**바이러스 정제 및 입자 관찰**

이병주의 절간을 배양하여 증식시킨 기내 배양묘에서 정제 바이러스를 가장 많이 얻을 수 있었다. 이는 Barba 등 (1989)이 기내 배양묘를 이용했을 때 전형적인 병징 발현 앞으로 순화한 것에 비해 30배 이상 바이러스 입자가 많이 관찰되었다는 보고와도 유사하였다. 이러한 결과는 포도 식물체내에 존재하는 탄닌성분, 즉 바이러스 순화시 저해하는 물질들이 기내 배양묘에는 보다 적고 조직들이 유연하여 마쇄가 용이하며 점질물 등이 적기 때문인 것으로 생각된다. 정제 바이러스를 전자현미경으로 관찰한 결과 입자들이 서로 엉겨붙어 있는 경우가 많았으며 정제과정중의 절단 등에 의해 입자 길이가 균일하지 않았지만 대략 길이 1800 nm, 폭 12 nm 정도의 입자들이 관찰되었다 (Figure 4).

Dip법으로 바이러스 입자를 관찰한 결과, 기내 배양묘에서 길이 1800 nm, 폭 12 nm 정도의 입자를 관찰할 수 있었으나 포장에서 채취한 병징발현 잎 조직에서는 dip법으로는 바이러스 입자가 관찰되지 않았다.



**A**



**B**

**Figure 3.** Comparison of sensitivity between RT-PCR and ELISA from *in vitro* cultured grapevine plantlet of mother plant, which was inoculated with GLRaV-3. A, ELISA results given as mean  $A_{405nm}$  of 4 replicate tests. Bars 1-6=GLRaV-3 infected sample sap in a ten-fold dilution series (1 :  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , respectively). H=Healthy *in vitro* plantlet. Horizontal line marks positive cutoff at 0.200; B, RT-PCR results for dilution series made of total RNA of GLRaV-3 infected *in vitro* grapevine plantlet; M, Size marker ( $\lambda$ DNA/Sty I); Lanes 1~9, ten-fold dilution series (1 :  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ , respectively).



**Figure 4.** Electron micrographs of GLRaV-3 particles and leaf symptoms in grapevine. A, Purified viruses (Bar=380 nm); B, leafroll and reddening.

포도나무에서 GLRaV-3을 검정하고자 할 때 바이러스 농도가 낮고 시료준비가 어려운 식물체 조직을 이용하는 것에 비해 기내에서 바이러스 증식이 비교적 빠르고 억제물질들이 적은 기내 배양묘를 이용함으로써 100 mg 정도의 적은 양으로 검출이 가능한 RT-PCR 진단 효율성을 높일 수 있었다. 또한 초본성 증식 기주작물이 아직까지 없어 증식상의 어려움과 목본성 식물체 조직 내에 많은 페놀화합물과 저농도의

바이러스 양 때문에 바이러스 정제가 어려운 문제 등을 조직 배양 기술을 이용함으로써 효과적으로 극복할 수 있을 것으로 생각한다. 따라서 감염성 초본 기주식물이 보고될 때까지는 기내 배양묘를 이용하는 방법이 GLRaV-3 *Closterovirus*의 연구 진전에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

또한 포도나무의 생육시기와 조직에 따라 바이러스 농도가 불균일한 점을 고려할 때 기내 배양묘를 이용함으로써 바이러스 검출 오류를 줄일 수 있고, 시기적 제한성을 극복하고 연중 실험이 가능하다는 점에서도 기내 배양묘의 이용 효율성이 클 것으로 판단되며, phloem에만 제한적으로 존재하고 농도가 낮은 바이러스와 같은 다루기 어려운 다른 과수작물의 바이러스들에서도 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 적 요

우리나라 포도원에서 가장 많이 발생하여 피해를 주고 있는 grapevine leafroll-associated 3 *Closterovirus* (GLRaV-3)를 대상으로 기내 배양묘를 이용한 바이러스 순화 및 진단 효율성을 검토하였다. 바이러스 감염주의 절간을 기내배양하여 증식시킨 기내 배양묘를 1개월 간격으로 계대배양하면서 배양묘를 ELISA 검정한 결과 고농도의 바이러스가 검출되었으며 배양묘의 부위별로 잎, 줄기 및 줄기 유래의 callus 조직에서 모두 고농도로 검출되었다. 또한 포장에서 재배되고 있는 포도나무의 잎이나 엽병조직에 비해 기내 배양묘의 조직을 사용하였을 때 높은 농도의 정제 바이러스를 얻을 수 있었으며, 전자현미경에 의한 dip 검경에서도 사상형 바이러스 입자가 관찰되었다. RT-PCR 진단에서는 기내 배양묘 조직을 사용하였을 때 포도 유엽조직과 엽병+중륵조직에 비해 검출 효율이 높았다. 기내 배양묘의 잎조직을 이용하여 ELISA와 RT-PCR 검정감도를 비교한 결과 ELISA에 비해 RT-PCR 검정이 약 1,000배 감도가 높았다.

## 인용문헌

Agranovsky AA (1995) Structure and expression of RNA genomes of closteroviruses. *Mol. Biol.* **29**:751-754  
 Barba M, Cupidi A, Faggiolo F (1989) *In vitro* culture of grapevine infected by Closterovirus Type III. *J Phytopathol.* **126**:225-230  
 Bar-Joseph M, Hull R (1974) Purification and partial characterization of sugar beet yellows virus. *Virology* **62**:552-562  
 Bar-Joseph M, Gumpf DJ, Dodds JA, Rosner A, Ginzberg I (1985) A simple purification method for citrus tristeza virus and estimation of its genome size. *Phytopathology* **75**:195-198  
 Boscia D, Greif C, Gugerli P, Martelli GP, Walter B, Gonsalves D (1995) Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative closterovirus. *Vitis* **34**:171-175

Candresse T, Martelli GP (1995) Genus Closterovirus. In : Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD (Eds), *Virus Taxonomy : Classification and Nomenclature of Viruses*. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, Berlin pp 461-464  
 Choueiri E, Boscia D, Digiario M, Castellano MA, Martelli GP (1996) Some properties of a hitherto undescribed filamentous virus of the grapevine. *Vitis* **35**:1-3  
 Goheen AC (1970) Virus and virus-like diseases of the grapevine. In : Frazier NW(ed.), *Virus Diseases of small fruits and grapevines*. Univ. of California, Div. of Agricultural Science, Berkely California USA. pp 209-212  
 Gugerli P (1990) Grapevine closteroviruses. Proc. 10th meeting ICVG, Volos, Greece. pp 40-51  
 Gugerli P, Brugger JJ, Bovey R (1984) L'enroulement de la vigne : Mise en evidence de particules virales et developpment d'une methode immuno enzymatique pour le diagnostic rapide. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic* **16**:299-304  
 Hu JS, Gonsalves D, Teliz D (1990) Characterization of closterovirus like particles associated with grapevine leafroll disease. *J Phytopathol* **128**:1-14  
 Iwanami T, Namba S, Yamashita S, Doi Y, Takahashi J, Ishii K (1987) Purification of grapevine leafroll virus. *Ann Phytopath Soc Jpa* **53**:655-658  
 Jang HI (1991) Symptoms and occurrences of grapevine virus diseases. RDA. *The Research and Extension* **32**:38-40  
 Martelli GP, Walter B (1998) Virus certification of grapevine. In : Hadidi A, Kherarpal RK, Koganezawa H (eds), *Plant Virus Disease Control*, APS press, pp 261-276  
 Minafra A, Hadidi A, Martelli GP (1992) Detection of grapevine closterovirus A in infected grapevine tissue by reverse transcription polymerase chainreaction. *Vitis* **31**:221-227  
 Mitsuo S (1987) Virus-free grapevine through shoot tip culture. *Plant Protection* **41**:418-422  
 Price M, Schell J, Grosser J, Pappu SS, Pappu HR, Febres V, Manjunath KL, Niblett CL, Derrick KS, Lee RF (1996) Replication of citrus tristeza closterovirus in citrus protoplasts. *Phytopathology* **86**:830-833  
 Woodham RC, Anteliff AJ, Krake LR, Taylor RH (1984) Yield differences between Sultana clones related to virus status and genetic factors. *Vitis* **23**:73-83  
 Yamakawa Y, Moriya M (1983) Ripening changes in some constituents of virus -free 'Cabernet Franc' grape berries. *J Jpa Soc Hort Sci* **52**:16-21  
 Yamakawa Y, Simizu H, Kushida T (1982) Seasonal changes in some constituents of 'Koshu' grape berries on normal and 'Ajinashi' vines. *J Jpa Soc Hort Sci* **50**:454-460  
 Zimmermann D, Bass P, Legin R, Walter B (1990) Characterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease on grapevine. *J Phytopathol* **130**:205-218