

## **Hatay Ve Tekirdağ İlleri Bağ Alanlarında Odun Dokusunda Deformasyona (Rugose Wood) Neden Olan Virüslerin Serolojik Ve Moleküler Yöntemlerle Saptanması Ve Karakterizasyonu**

Bahar TUNÇ Mona GAZEL Kadriye ÇAĞLAYAN  
Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü, 31000, Hatay

### **Özet**

Bu çalışma, bağ yetiştiriciliğinin oldukça önemli olduğu Hatay ve Tekirdağ illerinde üretilen farklı asma çeşitlerinde odun deformasyonuna neden olan viral etmenleri araştırmak amacıyla 2015-2016 yıllarında yürütülmüştür. Yerli ve yabancı bağ çeşitlerinden olmak üzere Hatay'dan toplam 100, Tekirdağ'dan 133 örnek alınmıştır. Odun deformasyonuna neden olan etmenlerden *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD) ve *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV)'ü DAS-ELISA ve/veya RT-PCR yöntemleri ile araştırılmıştır. DAS-ELISA sonuçlarına göre Hatay'da farklı asma çeşitlerinde %4,77 oranında GVA enfeksiyonu bulunurken, Tekirdağ ilinden alınan örneklerin hiçbirisinde GVA saptanamamıştır. Hatay ve Tekirdağ illerinden alınan asma örneklerinin RT-PCR yöntemiyle testlenmesi sonucunda, sırası ile en çok GVA (%69 ve %17), ve GRSPaV (RSP48-49 primeri ile %39 ve %40,6; RSP13-14 primeri ile %41 ve %12,96) tespit edilmiştir. GVD sadece Hatay ilinde %4 oranında saptanırken, testlenen örneklerde GVB bulunamamıştır. En çok rastlanan çoklu enfeksiyonlar ise GVA+GRSPaV (Hatay'da %37, Tekirdağ'da %12) olarak belirlenmiştir. Yapılan RT-PCR analizleri sonucunda GVA (429 bp), GVD (852 bp), GRSPaV (RSP48-49 primeri ile 330 bp ve RSPaV13-14 339 bp) için beklenen düzeyde DNA amplifikasyonları gözlenmiştir. GRSPaV'ünün seçilen 4 izolatının DNA dizilemesi yapılmış ve Gen Bankasında kayıtlı referans izolatlarla % 98-99 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Bağ, GVA, GVB, GVD, GRSPaV, ELISA, RT-PCR

## **Serological And Molecular Detection And Characterization Of Viruses, Which Are Causal Agents Of Wood Deformation (Rugose Wood) In Grapevine Producing Areas In Hatay And Tekirdağ Provinces**

### **Abstract**

Causal agents of rugose wood were investigated in different grape cultivars in Hatay and Tekirdağ provinces where grapevine cultivation is very important in 2015-2016. Totally 100 samples from Hatay and 133 samples from Tekirdağ were collected from foreign and local grape cultivars. Causal agents of rugose wood, *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD) and *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV) were tested by DAS-ELISA and/or RT-PCR. According to DAS-ELISA results, GVA was detected with 4,77% infection rate in different grapevine cultivars in Hatay. All tested samples were found negative for GVA in Tekirdağ province. In RT-PCR analysis, the most common viruses in Hatay and Tekirdağ provinces were found as GVA (69% and 17%) and GRSPaV (with RSP48-49 primer pairs 39% and 40,6%; with RSP13-14 primer pairs 41% and 12,96%). GVD was found only in Hatay province with 4% infection rate and GVB was not found in all tested samples. The most encountered multiple infections were detected as GVA+GRSPaV (in Hatay 37%, in Tekirdağ 12%). Based on RT-PCR analysis, expected size of DNA amplicons of GVA (429 bp), GVD (852 bp) GRSPaV (for RSP48-49 330 bp and for RSPaV13-14 339 bp) were obtained. Four

selected isolates of GRSPaV were sequenced and they showed 98-99% homology with the reference isolates deposited in GeneBank.

**Key words:** Grapevine, GVA, GVB, GVD, GRSPaV ELISA, RT-PCR.

## Giriş

Yerkürenin bağcılık için en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkemiz, asmanın gen merkezi olmasının yanı sıra son derece eski ve köklü bir bağcılık kültürüne de sahiptir. Anadolu'da bağcılık kültürünün tarihi oldukça eskiye dayanır. Ülkemizin değişik bölgelerinde yapılan arkeolojik kazılardan Anadolu'da bağcılık kültürünün M.Ö. 3000 yılına kadar dayandığı saptanmıştır (Oraman, 1965). Yurdumuzda ihraç edilen ürünlerimiz arasında olan üzümün besin değeri oldukça yüksek olup, yapılan araştırmalara göre A, B, B2 ve C vitaminleri içermektedir. Üzüm sofralık tüketim dışında kurutmalık, şaraplık, şıralık ve konservelik olarak da tüketilebildiğinden yılın her ayı beslenmede kullanılmaktadır. Son yıllarda asma yaprağının da ihraç edilmesiyle de önemli bir gelir elde edilmektedir. Dünya bağcılığında İspanya, Fransa, İtalya ve Çin'den sonra üretimde beşinci sırayı alan ülkemiz üretim miktarı bakımından 4.234.305 ton ile dünya sıralamasında 6. sırada bulunmaktadır (Anonim, 2014). Diğer tüm ürünlerde olduğu gibi bağcılığımızı tehdit eden önemli zararlı ve hastalıklar mevcuttur. Dünyada bağlarda yapılan çalışmalar sonucunda bağlarda (*Vitis* ve *Muscadinia*) 60'tan fazla farklı virüs saptanmıştır. Bu virüsler 3 farklı hastalık kompleksiyle ilişkilendirilmiştir:

- 1) Bulaşıcı dejenerasyon (Infectious degeneration) (Avrupa ve Akdeniz nepovirüsleri) ve geriye doğru ölüm (Amerikan nepovirüsleri),
- 2) Yaprak kıvrılma,
- 3) Odun dokusunda deformasyon: Gövde deformasyonu (Rugose wood) (Martelli, 2014).

Rugose wood ile enfekteli bağlarda belirtilerin daha şiddetli olduğu ve ilkbaharda tomurcukların açılmasının geciktiği gözlenmiştir. Bazen birkaç yıl içinde verim düşebildiği ve bitkinin ölebileceği bildirilmiştir

(Walter ve Martelli, 1997; Martelli ve Boudon-Padieu, 2006). Aşılı asmalarda genellikle tomurcuk birleşimi üzerinde şişkinlik, aşı ve kalem nispi çapı arasında belirgin bir fark görülür. Bazı çeşitlerde kabuk ile aşı birleşimi son derece kalın, mantarimsı ve kaba bir görünüm ile yumuşak bir dokuya sahiptir. Odunsu dokuda tipik olarak çukur ve oluklar şeklinde belirti görülür. Bu değişiklikler aşıda ya da kalemden oluşabilir. Çoğu durumda, bazı çeşitlerde yaprak kıvrıcılığı ile enfekteli yapraklara benzer şekilde kıvrılma sararma ya da kızarıklık göstermesine rağmen yapraklarda virüse özgü belirtiler görülmemektedir. Salkımlar daha küçük veya daha az olabilir. Enfekteli omcalarda verimin %55'ten %15'e düştüğü kaydedilmiştir (Walter ve Martelli, 1997; Martelli ve Boudon-Padieu, 2006). Bağlarda gövde deformasyonu (Rugose wood) kompleksine 4 farklı virüsün neden olduğu saptanmıştır: 1) GRSPaV; *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (Meng ve ark., 1998), 2) GVA; Kober stem grooving (Garau ve ark., 1997), 3) GVB ve GVD; Corky bark (mantarimsı kabuk), 4) LN33; taksonomik sınıflandırması yapılmamış virüs. Bağlarda saptanan GVE (gövde çukurlaşması) ve GVF (aşı uyumsuzluğu) ise bu hastalık kompleksi ile ilişkili bulunmamıştır. *Foveavirus* cinsinin üyesi olarak kaydedilen GRSPaV son derece önemli bir etmen olup yaygın bir hastalıktır. Vektörü henüz bilinmemektedir. GVA ve GVB *Vitivirus* cinsinin üyeleri olup yarı kalıcı olarak unlu bitlerle taşınır. *Vitivirus* cinsinin unlu bitlerle taşınan yeni üyesi GVE son yıllarda Japonya'da gövde deformasyonu: rugose wood belirtileri gösteren bağlarda kaydedilmiştir. LN33 gövde oluklaşması rugose wood hastalık kompleksinin bir üyesidir ve diğerleri gibi çoğaltma materyalleri ile yayılır. Bu etmenlerden GRSPaV mekanik olarak taşınmayan bir etmen olup vektörü bilinmemektedir. GRSPaV, *Betaflexiviridae* familyası *Foveavirus*

cinsine ait olup (Martelli ve ark., 2007) bağlarda en yaygın bulunan virüslerden biridir. Bu çalışma ile bağ yetiştiriciliğinin oldukça önemli olduğu Hatay ve Tekirdağ illerinde yetiştirilen yerli ve yabancı asma çeşitlerinde odun deformasyonuna neden olan etmenlerden *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD) ve *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV)'un DAS-ELISA ve/veya RT-PCR yöntemleriyle saptanması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Yöntem

### Arazi çalışmaları ve örnekleme

Arazi çalışmaları Hatay ve Tekirdağ illerinde yoğun olarak bağcılığın yapıldığı ilçelerde yürütülmüştür. Hatay'da Antep Karası ve Pafu, Tekirdağ'da ise Antep Karası, Kalecik Karası, Dimyat, Alicante Bouschet, Chardonnay, Pinot noir, Hamburg Misketi, Alphonse Lavallee, Cardinal, Çavuş, Gamay, Palieri, Zinfandel ve Şiraz gibi önemli yerli ve yabancı, sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerine ait virüs belirtisi gösteren omcalardan toplam 233 örnek alınmıştır.

### Serolojik Çalışmalar

#### DAS ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzim Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi

DAS-ELISA testlerinde GVA belirteçleri (IgG ve konjugat) Bioreba-İsviçre'den, GVB belirteçleri ise Sediag-Fransa'dan temin edilmiştir. Virüs belirteçlerinin sulandırma oranı firmanın protokolde belirttiği oran göz önünde bulundurularak testlemeler Clark ve Adams (1977)'a göre yapılmıştır.

### Moleküler Çalışmalar

#### Toplam Nükleik Asit (TNA) İzolasyonu

Bağlardan toplanan örneklerden RNA izolasyonu Qiagen RNA Plant mini kitinin firma önerisine göre ve MacKenzie ve ark. (1997)'nin önerdiği modifiye yöntemle yapılmıştır. İlbahar döneminde yapraklar, sonbahar ve kış döneminde ise sürgünlerden hazırlanan floem kazıntıları kullanılarak RNA ekstrakte edilmiştir. Örneklerden ekstrakte edilen RNA'ların miktar ve kaliteleri

Nanodrop spektrofotometre (NanoDrop 1000c, Thermo) ile ölçülerek değerlendirilmiştir.

#### Ters Transkripsiyon (Revers Transcription)

İlk aşamada, ekstrakte edilen RNA'lardan cDNA elde edilmiştir. Her bir örnek için 1 µl Random hexamer primer, 6,5 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O ve 5 µl RNA karıştırılarak PCR cihazında 94 °C'de 5 dakika ve -20 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 5xRT Buffer'dan (Fermentas) 4 µl, DTT (0.1 mM)'den 2 µl, dNTP (10 mM) 0,5 µl ve RT enziminden 1 µl eklenmiştir. PCR cihazında 42 °C'de 1 saat 72 °C'de 10 dakika olarak programlanmış ve cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır.

#### Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR)

GRSPaV, GVA, GVB ve GVD virüsleri için elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR yönteminde GVA MP/CP gen bölgesi için; GVA V1-GACAAATGGCACACTACG, GVA C1-AAGCTGACCTAGTCATCTTGG (429 bp), GVB CP (kılıf protein) gen bölgesi için; GVB V1-GTG CTA AGA ACG TCT TCA CAG C GVB C1-ATC AGC AAA CAC GCT TGA ACC G (459 bp) (Minafra ve ark., 1994), GVD CP ve RNA binding Protein gen bölgesi için; GVD F-GACGCAGGGATGTACCTTAGGACG GVD R-CCTCTACTTATGGAAATTGCGCTC (852 bp) (Fajardo ve ark., 2012), GRSPaV CP gen bölgesi için; RSP48-AGCTGGGATTATAAGGGAGGT RSP49-CCAGCCGTTCCACCACTAAT (330 bp) (Zhang ve ark., 1998) ile ORF'nin Helicase-like domain gen bölgesi için; RSP13-GATGAGGTCCAGTTGTTTCC RSP14-ATCCAAAGGACCTTTTGACC (339 bp) (Meng ve ark., 1999) primer baz dizileri kullanılmıştır.

PCR karışımı, GVA, GVB, GVD, RSPaV 48-49 için; 16,8 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 10XB (Fermentas), 0,5 µl dNTP (10 mM), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), virüse özgü 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase (5 U/µl) ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. RSPaV13-14 için ise; 16,8 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 10XB (Fermentas), 2 µl dNTP (2,5 mM), 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), virüse özgü

0,5 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,125 µl Taq-DNA polimeraz (5 U/µl) ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR cihazı;

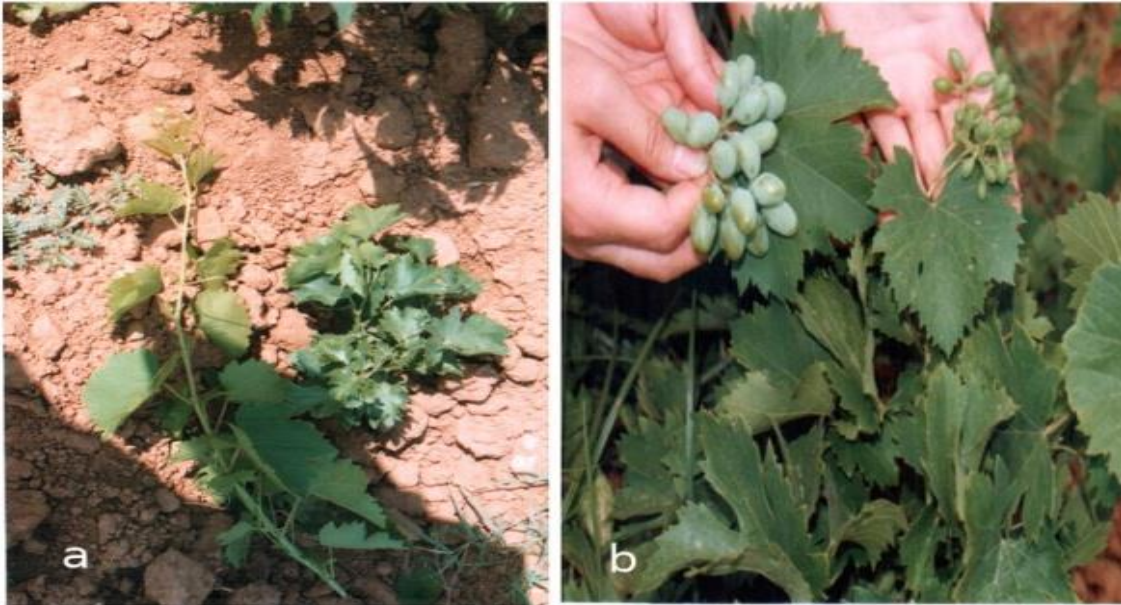
- GVA için: 1 döngü 94 °C'de 5 dakika; 35 döngü 94 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olarak,
- GVB ve GVD için; 1 döngü 94 °C'de 5 dakika; 35 döngü 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olarak,
- RSPaV virüsü için kullanılan her iki primer çifti (RSP48-RSP49 ve RSP13-PSP14) için; 1 döngü 94 °C'de 5 dakika; 35 döngü 94 °C'de 30 saniye, 57 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olarak programlanmıştır.

#### Dizileme ve Filogenetik Analiz

PCR analizleri sonucunda GRSPaV'ünün RSP48-49 primer çifti (330 bp) ve RSP13-14 primer çifti (339 bp) referans kontrolüyle aynı seviyede bant veren izolatlardan 4 tanesi seçilerek DNA dizilemeleri yapılmak üzere İontek (İstanbul) firmasına gönderilmiştir.

#### **Bulgular ve Tartışma**

Hatay ili bağ alanlarından toplam 100, Tekirdağ ilinden ise toplam 133 örnek alınmış ve omcalarda gelişme geriliği, yapraklarda küçülme, meyve olgunlaşmasında gecikme ve danelerde küçülme belirtileri gözlemlenmiştir (Şekil 1). Yapılan çalışmalarda Rugose wood ile enfekteli bağlarda belirtilerin daha şiddetli olduğu ve ilkbaharda tomurcukların açılmasının geciktiği, birkaç yıl içinde verimin düştüğü ve bitkinin öldüğü gözlemlenmiştir.

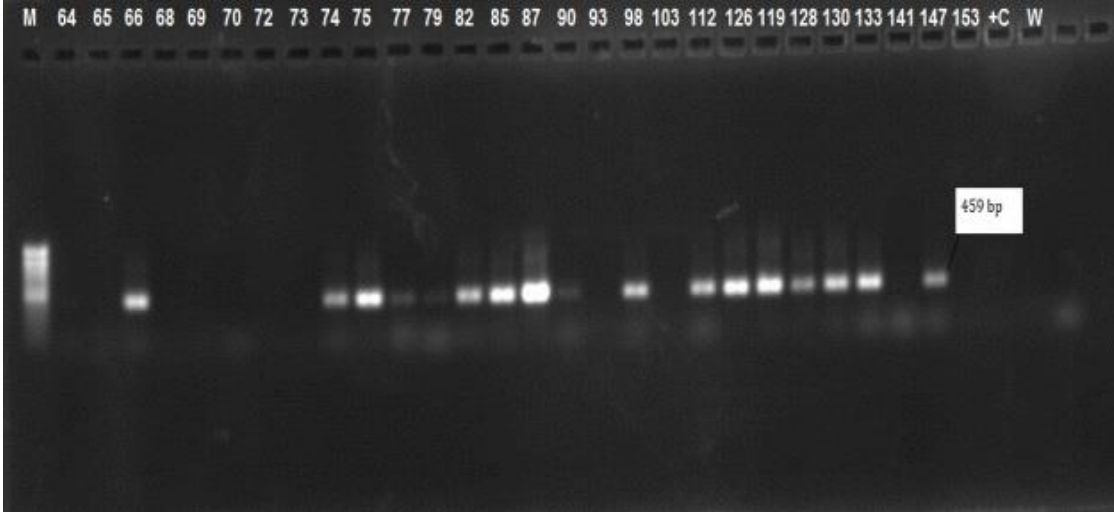


Şekil 1. *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* ile enfekteli bağlarda gözlenen a- Yapraklarda küçülme b- Dane kaybı ve verim azalması belirtileri.

Figure 1. Symptoms observed on grapevines infected by *Grapevine rupestris stem pitting associated virus*; a-Small leaves b- Decrease on quantity and grain losses.

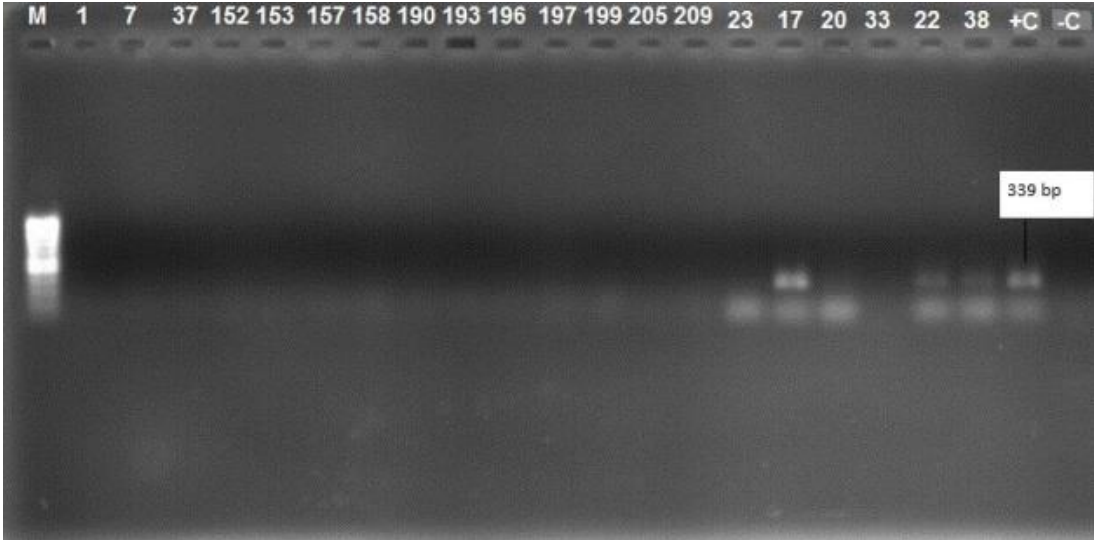
Tekirdağ ilinden toplam 102, Hatay ilinden ise 100 bitki örneği DAS-ELISA yöntemiyle GVA ve GVB açısından testlenmiştir. Hatay ilinde GVA ile enfeksiyon oranı %4,67 olarak saptanırken, GVB bulunmamıştır. Tekirdağ ilinde ise her iki virüs saptanmamıştır. GVA, GVD, GRSPaV için

virüslere spesifik primer çiftleri kullanılarak RT işlemi sonucunda elde edilen cDNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda GVA (429 bp), GVD (852 bp) GRSPaV (RSP48-49 primeri ile 330 bp ve RSP13-14 primeri ile 339 bp) için beklenen düzeyde DNA amplifikasyonları gözlemlenmiştir (Şekil 2, 3, 4).



Şekil 2. *Grapevine virus A* (GVA)'ya karşı yapılan RT-PCR analizi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi.

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplified products for *Grapevine virus A* (GVA).

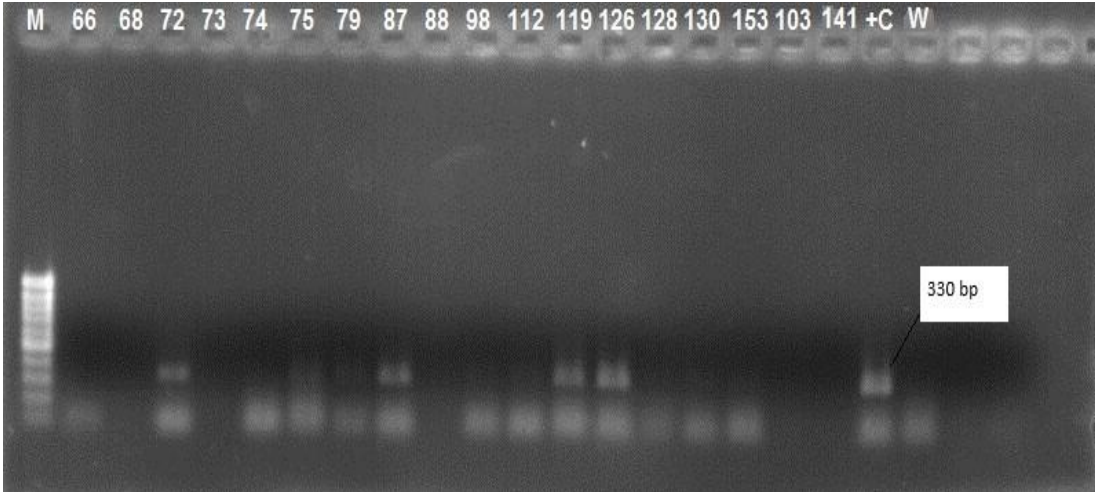


Şekil 3. *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV)' üne karşı RSP13-14 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi.

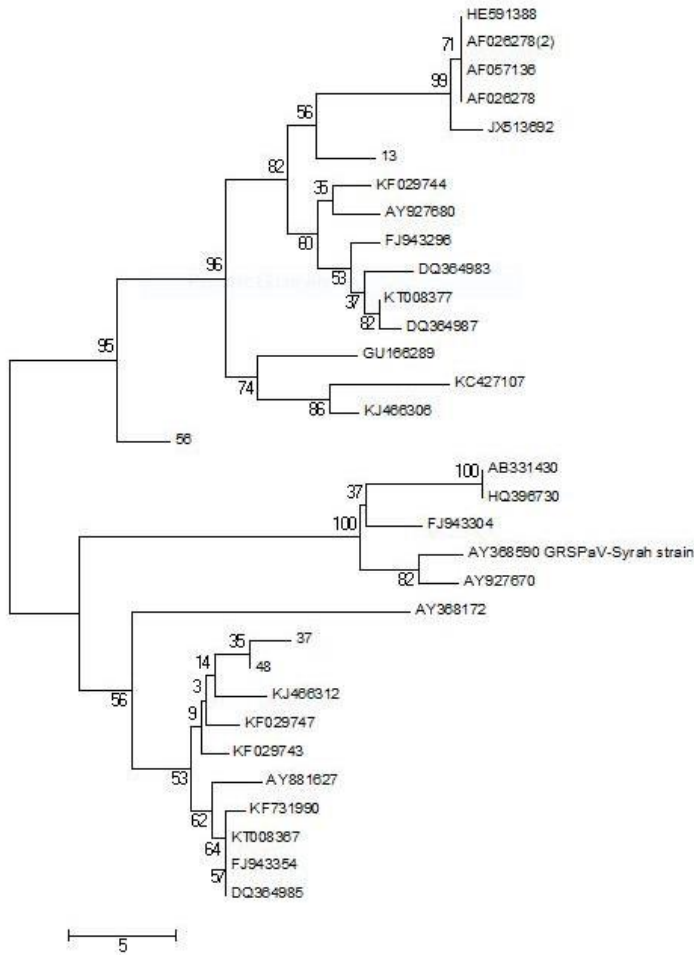
Figure 3. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplified products by using RSP13-14 primer pair for *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV).

Hatay (100 örnek) ve Tekirdağ (133 örnek) illerinden toplanan asma örnekleri RT-PCR yöntemiyle testlenmiştir. Bu örneklerin GVA, GVB, GVD, GRSPaV ile enfekte olma oranlarının RT-PCR analizleri sonucunda, Hatay ilinden toplanan asma örneklerinde %69 enfeksiyon oranıyla en yaygın olarak saptanan virüs GVA olarak belirlenmiş olup, bunu %41 enfeksiyon oranıyla GRSPaV izlemiştir. Tekirdağ ilinden toplanan asma

örneklerinde %40,6 enfeksiyon oranıyla en yaygın olarak saptanan virüs GRSPaV olup, bunu %17 enfeksiyon oranıyla GVA takip etmiştir. Hatay ilinde bağlardaki GVD enfeksiyon oranı % 3.48 oranıyla oldukça düşük bulunmuş olup Tekirdağ ilinde bu virüs enfeksiyonuna rastlanmamıştır. Testlenen tüm örneklerde GVB enfeksiyonu saptanamamıştır. GRSPaV'nin testlenmesinde 2 farklı primer çifti kullanılmıştır.



Şekil 4. *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV)'üne karşı RSP48-49 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi.  
Figure 4. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplified products by using RSP48-49 primer pair for *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV).



Şekil 5. Tekirdağ bağ örneklerinden elde edilen GRSPaV izolatlarının gen bankasında kayıtlı izolatlarla karşılaştırılması sonucu elde edilen filogenetik ağaç.

Figure 5. Phylogenetic tree obtained from Tekirdağ GRSPaV grapevine isolates and Genbank isolates.

Hatay ilinden toplanan asma örneklerinde GRSPaV'nin testlenmesinde kullanılan primer çiftlerinin etkinliğinde bir farklılık görülmezken Tekirdağ ilinden toplanan bağ örneklerinde bu oran RSP48-49 primer çifti için %40,6 ve RSP13-14 çifti için %12,9 olmuştur. Bu etmenler arasında GRSPaV'nin dünyada olduğu gibi çalışmamızı yürüttüğümüz Hatay ve Tekirdağ illerimizde de yaygın olduğu tespit edilmiştir. PCR analizleri sonucunda GRSPaV'nin referans kontrolüyle aynı seviyede bant veren izolatlardan 4 tanesi seçilerek DNA dizilemeleri yapmak üzere firmaya gönderilmiştir. Firmadan gelen her bir izolatın nükleotid dizilimi gen bankasında kayıtlı izolatlarla karşılaştırılmıştır. Sekansı yapılan 4 adet GRSPaV izolatı Gen Bankasında kayıtlı izolatlarla nükleotid benzerlikleri %98-94 arasında olmuştur (Şekil 5).

GRSPaV'nin mekanik olarak taşınmadığı ve vektörü bilinmediğinden dolayı muhtemel aşı kalemiyle yayıldığı düşünülmektedir. Bu nedenle sağlıklı aşı kalemi kullanılması önerilmektedir. GVA'nın unlu bitlerle taşınmasından dolayı, bu böcek türlerinin kontrol altında tutulması önerilmektedir.

### Teşekkür

Bu çalışma MKU-BAP 15165 nolu proje kapsamında yapılmıştır.

### Kaynaklar

- Anonim 2014. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- Clark MF, Adams AN, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-83.
- Fajardo TVM, Eiras M, Nickel O, Dubiela CR, Souto ER, 2012. Detection and partial molecular characterization of *Grapevine fleck virus*, *Grapevine virus D*, *Grapevine leafroll-associated virus -5* and *-6* infecting grapevines in Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria. 42 (12): 2127-2130.
- Garau R, Prota VA, Piredda R, Boscia D, Prota U, 1997. On the possible relationship between

- Kober stem grooving and Grapevine virus A. *Vitis*, 33: 161-163.
- MacKenzie DJ, Mclean, MA, Mukerji S, Green M, 1997. Improved RNA extraction for woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease*, 81: 222-226.
- Martelli GP, 2014. Directory of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine and Their Agents. *Journal of Plant Pathology*, 96: 1-136.
- Martelli GP, Boudon-Padieu E, 2006. Directory of infectious diseases of grapevines. *Options Méditerranéennes, Series B55*: 11-201.
- Martelli GP, Adams MJ, Kreuze JF, Dolja VV, 2007. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 73-100.
- Meng B, Pange SZ, Forsline PL, Mcferson JR, Gonsalves D, 1998. Nucleotide sequence and genome structure of grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to apple stem pitting. *Journal of General Virology*, 79: 2059-69.
- Meng B, Zhu HY, Gonsalves D, 1999. Rupetris stem pitting associated virus-1 consists of a family of sequence variants. *Archives of Virology*, 144: 2071-2085.
- Minafra A, Saldarelli P, Grieco F, Martelli GP, 1994. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viruses. *Archives of Virology*, 137: 249-261.
- Oraman MN, 1965. Arkeolojik Buluntuların Işığında Türkiye Bağcılığının Tarihçesi Üzerinde Araştırmalar. *Ankara Ün. Ziraat Fak. Yıllığı*. 15(2): 96-108.
- Walter B, Martelli GP, 1997. Clonal and sanitary selection of the grapevine. In : Walter B (ed.) *Sanitary Selection of the Grapevine. Protocols for the Detection of viruses and virus-like Diseases*. Les Colloques, Paris, France: INRA Editions, 86: 43-95.
- Zhang Y, Uyemoto JK, Golino D, Rowhani A, 1998. Nucleotide sequence and genome structure of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus-1* reveal similarities to *Apple stem pitting virus*. *Journal of General Virology*, 79: 2059-2069.