식물생명공학회지 제32권 제1호
Korean J. Plant Biotechnol.
Vol. 32, No. 1, 45~50 (2005)

열처리와 Shoot-Tip Grafting에 의한 감귤 바이러스 무독묘 생산

김대현[1], 심혜경[2], 권혁모[3], 현재욱[3], 김광식[4], 이진경[2], 이석찬[2*]
[1]농촌진흥청 평가조정담당관실, [2]성균관대학교 유전공학과, [3]난지농업연구소 난지환경과, [4]난지농업연구소 감귤과

Production of Virus-Free Stocks from Citrus Plant by the Shoot-Tip Grafting and Heat Treatment

Daehyun Kim[1], Hyekyung Shim[2], Hyeogmo Kwon[3], Jaewook Hyun[3], Kwangsik Kim[4], Jinkyung Lee[2], Sukchan Lee[2*]
[1]*Evaluation and Coordination Office of the Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea,*
[2]*Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea,*
[3]*Agricultural Environment Division of National Institute of Subtropical Agriculture, RDA, Jeju 449-701, Korea,*
[4]*Citrus Research Division of National Institute of Subtropical Agriculture, RDA, Jeju 449-701, Korea,*

ABSTRACT Virus-free stocks was produced by the combination of the heat treatment of virus infected plant and shoot-tip grafting (STS). To produce virus-free stocks, the plants infected with citrus viruses were used for virus-free stock production using the modified method of STG in thermotherapy at 40℃ for 16 hours in the light, and at 30℃ for 8 hours of darkness for 4 weeks. Trifoliate orange (*P. trifoliata*) were used as rootstock seedling for STG. Percentages of virus-free stocks against citrus tristeza virus (CTV), satsuma dwarf virus (SDV) and citrus tatter leaf virus (CTLV) were 75.7%, 100.0%, 82.6% respectively. Shoot tip size for successful STG were as small as possible. Less than 0.3 mm of shoot tips gave the hight efficiency of virus free plants but survival rates were low. And, survival rate after shoot-tip culture was analyzed and the rates were dependant on the cultivars; Yuzu cultivar showed the hight survival rate (74.6%) and early satsuma mandarin (Iwasagi) was 13.3% as the lowest cultivar. But citrus trees were not succeed to grown, turned brown, and died.

Key words: Citrus virus, shoot-tip grafting, shoot-tip culture, virus-free stocks

서 론

감귤 바이러스 병은 캘리포니아의 Fawcett (1932)에 의해 Psorosis가 발견된 이래 지금까지 여러 종류가 확인되었고, 그 병원 바이러스도 20여 종이 알려지고 있다 (Agrios 1988). 일본에서는 10여 종이 분리 · 보고 되었으며 특히 온주위축병, 모자이크병, 접목부이상증, 스템피팅병, 엑스코티스병 등이 감귤나무에 주로 피해를 주고 있다 (Miyakawa and Yamaguchi 1981).

*Corresponding author Tel 031-290-7866 Fax 031-290-7870
E-mail cps6546@nambu.ac.kr

제주도에서는 온주위축병, 접목부이상증, stem-pitting병 등 바이러스가 존재하며 이들 바이러스는 감귤나무의 생육과 수세를 약화시키고 과일의 당도저하, 수량감소, 기형과 발생 등의 피해가 있음이 보고되었다 (Kwon and Koh 1985). Kim 등 (1999)은 1997년까지 제주도를 35지역으로 구분하여 감귤 품종별로 citrus tristeza virus (CTV), satsuma dwarf virus (SDV), citrus tatter leaf virus (CTLV)에 대하여 enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) 검정법으로 감염상황을 조사한 결과, 69.8%, 9.3%, 8.6% 감염율을 나타내었고 ELISA 검정법과 병행하여 RT-PCR을 통해 CTV를 진단한 결과 RT-PCR을 이용한 경우에 좀 더 정확하고 정밀하게 바이러스를 진단할 수 있었다 (Kim et al. 2000).

바이러스 병의 방제 대책은 현재로서는 감귤의 형질전환 효율이 너무 낮아 바이러스 coat protein이나 replicase 등을 이용한 바이러스 저항성 감귤의 육성은 불가능하며 또한 바이러스 병에 대한 실용적인 방제약제가 없기 때문에 인증 받은 감귤나무로부터 접수를 채취하여 무독묘목을 생산하며 바이러스의 전파를 막기 위한 매개충 방제가 유일한 방법이다. 무독묘 생산을 위해서는 직접 과원에서 무독모주를 선발하여 증식하는 방법이 있지만 이 방법은 성목의 경우 수체부위에 따라 바이러스 농도가 다양할 뿐만 아니라 진단 시기 및 진단방법 등의 문제가 많으므로 실제 이용에는 어려운 점이 많다. 따라서 최근에는 열처리나 화학약품처리, 경정배양 (shoot-tip culture), 캘러스 배양, 원형질체 배양, 경정접목법 (shoot-tip grafting) 등 많은 방법들이 연구되고 있지만, 주로 열처리와 경정배양법이 효과적으로 많이 이용되고 있다 (Iwanami et al. 1993). 식물조직에 감염된 바이러스들은 기주식물에 큰 장해를 주지 않는 범위내의 높은 온도로 열처리를 하면 부분적 혹은 완전히 불활성화 되며 분열세포에서 바이러스의 복제가 저해되어 제거된다 (Calavan et al. 1972). 그러나 열처리만으로는 불활성화되지 않는 바이러스들도 많기 때문에 무독묘 생산의 효율성을 높이기 위하여 경정배양을 함께 병행하는 방법이 실용화되고 있다 (Iwanami et al. 1993).

Murashige 등 (1972)은 처음으로 바이러스에 감염된 식물체를 열처리한 후 생장점을 0.2 mm 크기로 잘라 대목에 접을 붙이는 방법으로 무독묘를 생산해내는데 성공하였으며, Su와 Chu (1984)는 기내접목 시 대목의 접목부분 형태를 T 모양에서 삼각형 모양으로 변형시킴으로서 접목활착율을 20%에서 60%로 높였다. 또한 Iwanami 등 (1993)은 CTLV에 감염된 rough lemon (*C. jambhiri*) 신초 끝을 1 mm의 크기로 잘라내어 5 μM GA_3, 1 μM BA, 0.1 μM NAA가 첨가된 MS 배지에서 키운 다음 열처리 및 ribavirin 100 ppm을 첨가하여 무독묘를 생산하였다.

본 연구는 제주도내 감귤바이러스 감염된 보독묘를 대상으로 열처리 및 경정접목 또는 경정배양을 통해 무독묘를 생산함으로써 우량묘목 생산체계를 구축하고 감귤 바이러스의 피해가 없는 고품질의 과실을 생산하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

경정접목에 의한 바이러스 무독묘 생산을 위하여 Table 1에서 제시한 바와 같이, CTV에 감염된 감귤나무인 경우, early satsuma mandarin (*C. unshiu*) 6개체, Yuzu (*C. junos*) 26개체, Shiranuhi ([*C. unshiu*×*C. Sinensis*])×*C. Reticulata*) 5개체 등 전체 37개체를 사용하였으며, SDV는 early satsuma mandarin 7개체, Yuzu 4개체 등 전체 11개체, CTLV인 경우에는 early satsuma mandarin 5개체, Yuzu 15개체 그리고 Shiranuhi 3개체 등 전체 23개체를 사용하였다.

경정접목

경정접목은 바이러스에 감염된 감귤 보독묘를 열처리실에서 주간 40℃, 야간 30℃로 열처리하여 발아된 shoot-tip의 생장점 부위를 약 0.3～0.7 ㎜ 크기로 잘라내어 *in vitro*에서 육묘된 탱자 (*P. trifoliata*) 대목에 접목하였다 (Su and Chu 1984). 접목묘는 경정접목 액체배지에서 2일간 암 상태에서 배양한 후 광조건 (1,000 LUX) 아래에서 2주간 배양하고, 충분한 광 조건하 (5,000 LUX) 에서 2～3주간 배양한 후에 건전한 대목에 이중접목 (double grafting) 하였다. 여기에서 대목으로 사용된 탱자 (*P. trifoliata*) 발아배지는 MS 기본배지를 사용하였고, 경정접목 배지는 MS 배지 1000 mL에 sucrose 75 g, inositol 0.1 g, 비타민으로 thiamine hydrochloride 2 ㎎, pyridoxine hydrochloride 10 ㎎, nicotinic acid 10 ㎎을 첨가하여 pH 5.7로 조정한 후 사용하였다.

경정배양

바이러스에 감염된 satsuma mandarin을 주간 40℃, 야간 30℃의 온도로 맞춘 생육 상에서 1개월 이상 열처리한 후 새로 자란 shoot tip을 5 mm정도로 잘라서 경정배양 시켰다. 배지는 0.1 μM NAA, 1 μM BA, 그리고 50 μM GA_3을 첨가시킨 MS배지에 0.2% gelrite을 넣어 사용하였다 (Iwanami et al. 1993).

결과 및 고찰

열처리 효과

CTV에 감염된 Yuzu 및 Shiranuhi 품종을 대상으로 생육상에서 주간 40℃, 야간 30℃로 열처리를 하여 생육시키면서 시기별로 CTV 농도를 ELISA로 측정하였다 (Figure 1). 열처리를 계속함에 따라서 Shiranuhi 경우에는 열처리 후 16일이 경과 한 후에, 그리고 Yuzu 품종은 1개월 후에 바이러스에 대한 측정값이 감염 한계점 (O.D. 0.174)보다 낮게 측정되어 열처리의 효과가 있음을 알 수 있었다. 그러나 열처리 후 온도를 실온으로 유지해 바이러스 농도값을 측정한 결과 Figure 2에서 보는 바와 같이 Shiranuhi는 16일이 경과함에 따라서 바이러스 감염한계점 (O.D. 0.138) 이상으로 증가하였으나, Yuzu인 경우에는 67일 이상 시간이 경과해야 바이러스 감염 한계점으로 측정값이 증가하는 결

과를 얻었다. 이상에서 보는 바와 같이 감귤 바이러스에 감염된 감귤나무인 경우 열처리 방법만으로는 무독묘를 생산이 불가능하다는 것을 알 수 있었다.

Miyakawa 등 (1983) 은 바이러스 감염주를 열처리 시 바이러스 활성을 떨어뜨려 줄기의 생장속도보다 바이러스 이동속도가 느리기 때문에 무독화가 가능하다 하였고 Calavan 등 (1972)은 식물조직에 감염된 바이러스들은 높은 온도에 의해 부분적으로 불활성화 된다고 보고하였는데 본 연구에서도 열처리 시 그와 유사한 결과를 보였다.

경정접목에 의한 무독묘 생산

열처리 후 경정접목을 수행하여 바이러스 무독화율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. CTV인 경우 satsuma mandarin 66.7%, Yuzu 76.9%, Shiranuhi 80.0%의 무독화율을 보여 세 품종 평균 75.7%의 무독화율을 나타내었으며, SDV인 경우에는 satsuma mandarin, Yuzu 모두 전 개체가 무독화가 되어 다른 감귤바이러스에 비하여 무독화율이 월등히 높았다. 그리고 CTLV의 경우에는 세가지 품종에 대해 평균 82.6%의 무독화율을 나타내었다. 이와 같이 열처리로 바이러스의 무독화 결과는 Miyakawa (1983)가 CTLV에 감염된 병감, 금감, 수황문단, 야전온주 등을 주간 40℃, 야간 30℃로 열처리 후 120일간 이상을 생육시켜서 신장된 새순으로 무독개체를 얻었다는 보고와 유사하였다.

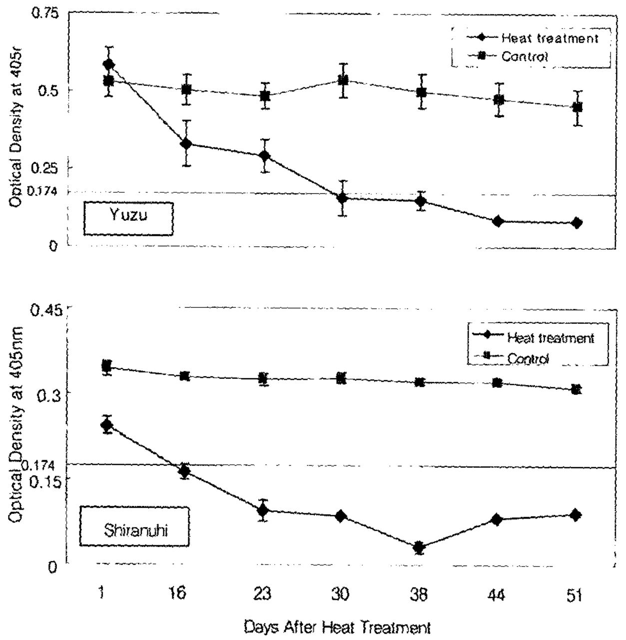

Figure 1. Change of virus concentration in heat treated Yuzu and Shiranuhi (40℃ or 16hr in the daytime, 30℃ or 8hr at night). Values are mean ± standard deviation with three replications.

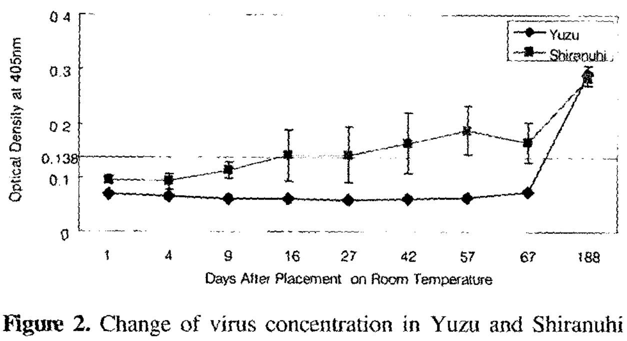

Figure 2. Change of virus concentration in Yuzu and Shiranuhi leaved in room temperature after heat treatment (day 40℃ night 30℃ for 47 days. Values are mean ± standard deviation with three replications.

Table 3은 열처리한 후 경정접목 시 접수의 크기별 활착율 및 무독화율을 나타낸 결과로서 접수의 크기가 0.3 mm 이하에는 활착율은 16.7%로 낮았으나 100.0%의 무독화율을 보였고, 0.3~0.5 mm시에는 활착율이 31.8%, 무독화율은 85.7%, 그리고 0.5~0.7 mm시에는 활착율 42.9%, 무독화율 66.7%로 CTV인 경우 접수의 크기를 작게 자를수록 활착율은 떨어지나, 무독화율은 높음을 알 수 있었다. 일본의 Takahara (1986)도 주간 40℃, 야간 30℃로 열처리한 후 0.8~1.0 mm 크기로 접수를 잘라서 대목에 semi-shoot tip grating을 이용하여 바이러스 무독묘를 생산하였다는 보고를 하였으나, 본 연구결과에 비해 무독화율은 낮았다. 따라서 경정접목을 이용하여 무독묘를 생산할 때에는 접수의 크기를 0.3~0.5 mm 정도로 하는 것이 효율적이라고 판단된다.

경정배양에 의한 무독묘 생산

경정배양 1개월 후에 생존율을 조사한 결과, Yuzu의 생존율이 74.6%로서 가장 높았고 satsuma mandarin과 Shiranuhi는 41.1%부터 54.5%의 생존율을 보인 반면에, Miyamoto와 Iwasagi 등 early satsuma mandarin은 14.3% 이하의 낮은 생존율을 보였다 (Table 4). 이와 같이 온주밀감 계통에서 생존율이 낮은 것은 아직까지 인공배지 내에서의 배양 조건이 확립 되어있지 않고 삽목을 통한 식물체 증식 과정이 매우 어렵기 때문인 것으로 생각된다. 아울러 항 바이러스제의 효과를 보기 위해 MS 배지에 0.1 μM NAA, 1 μM BA, 5 μM GA_3을 첨가시키고 rivabirin 100 ppm을 넣어서 배양한 결과 조직배양 초기에는 로젯 (rosette)모양으로 생장이 가능 하였으나, 3개월 이상 시간이 경과함에 따라서 증식이 불가능하여 고사되었다 (data not shown). Omura와 Hidaka (1993)는 MS배지에 0.1 μM NAA, 1 μM BA, 5 μM GA_3을 첨가시켜 1 ㎜의 크기로 잘라서 double phase culture를 수행한 결과 rivabirin 100 ppm에서 무독개체를 얻었고 Iwanami 등 (1993)은 CTLV에 감염된 Rough lemon (*C. jambhiri*)을 1 mm의 크기로 잘라내어 5 μM GA_3, 1 μM BA, 0.1 μM NAA가 첨가된 MS배지에다 키운 다음 열처리 및 ribavirin 100 ppm을 첨가하여 무독묘를 생산하였는데 본

Table 1. Citrus cultivars used as sources of shoot-tips and the result of virus indexing with ELISA after shoot-tip grafting

No.	Cultivar	Before shoot-tip grafting			After shoot-tip grafting			Harvesting sites
		CTV[a]	SDV[b]	CTLV[c]	CTV	SDV	CTLV	
1	ESM[z]	+	-	+	-	-	-	Harye
2	Yuzu	+	-	+	+	-	-	Harye
3	Shiranuhi	+	-	+	-	-	-	Harye
4	Yuzu	+	-	-	-	-	-	Harye
5	ESM	-	+	-	-	-	-	Harye
6	Yuzu	+	-	+	+	-	-	Harye
7	Yuzu	+	-	+	-	-	-	Harye
8	Yuzu	+	-	-	-	-	-	Harye
9	ESM	+	+	-	-	-	-	Harye
10	ESM	-	-	+	-	-	-	Harye
11	Yuzu	+	-	+	+	-	-	Namwon
12	Yuzu	+	+	-	-	-	-	Namwon
13	ESM	+	-	+	-	-	-	Namwon
14	Yuzu	+	-	-	-	-	-	Namwon
15	Yuzu	+	-	+	-	-	-	Namwon
16	ESM	+	-	+	+	-	-	Namwon
17	Yuzu	+	-	-	+	-	-	Namwon
18	Yuzu	+	-	+	-	-	-	Namwon
19	Yuzu	+	-	+	+	-	-	Namwon
20	ESM	+	-	+	+	-	-	Namwon
21	ESM	-	+	-	-	-	-	Juongmun
22	Yuzu	+	-	+	-	-	-	Juongmun
23	Yuzu	+	+	-	-	-	-	Juongmun
24	Yuzu	+	+	-	-	-	-	Juongmun
25	Yuzu	+	-	-	-	-	-	Juongmun
26	Yuzu	+	-	+	-	-	-	Juongmun
27	Yuzu	+	-	+	-	-	-	Juongmun
28	Yuzu	+	-	-	-	-	-	Juongmun
29	ESM	-	+	-	-	-	-	Juongmun
30	Yuzu	+	-	-	-	-	-	Juongmun
31	Yuzu	+	-	+	+	-	-	Nohyong
32	Yuzu	+	-	+	-	-	+	Nohyong
33	ESM	+	+	-	-	-	-	Nohyong
34	ESM	-	+	-	-	-	-	Nohyong
35	Yuzu	+	-	+	-	-	-	Nohyong
36	ESM	-	+	-	-	-	-	Nohyong
37	Yuzu	+	+	-	-	-	-	Nohyong
38	Yuzu	+	-	+	-	-	+	Nohyong
39	Yuzu	+	-	+	-	-	+	Nohyong
40	Shiranuhi	+	-	-	-	-	-	Nohyong
41	Shiranuhi	+	-	-	-	-	-	Nohyong
42	Shiranuhi	+	-	+	-	-	-	Nohyong
43	Shiranuhi	+	-	+	+	-	+	Nohyong

[z]Early satsuma mandarin; [y]virus infections were evaluated by ELISA, + ; positive reaction, - ; negative reaction. [a]Citrus tristeza virus; [b]satsuma dwarf virus; [c]citrus tatter leaf virus.

연구에서는 증식이 불가능하여 추후 항 바이러스제인 ribavirin 효과에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

감귤바이러스 무독묘 생산하여 농가에 보급하는 것은 감귤의 고품질을 생산하기 위하여 무엇보다도 중요한 일이라 할 수 있다. 본 연구에서 열처리에 이은 경정접목 방법으로 생산된 무독묘는 증식을 위하여 실생으로 키운 탱자 대목에 이중 접목을 하며 (Figure 3), 매개충으로부터 바이러스 감염을 방지하기 위하여 망실에서 증식 중에 있으며 바이러스 보독여부를 확인하기 위해 CTV와 CTLV는 RT-PCR에 의해, 그리고 SDV는 ELISA에 의해 년 1회 바이러스의 감염여부를 검사하고 있다.

그러나 농가에 무독묘가 생산되어 보급되었을 때 포장에

Table 2. Percentage of virus-free stocks by citrus tristeza virus, satsuma dwarf virus, and citrus tatter leaf virus

Cultivars	Percentage of virus-free stocks		
	CTV[a]	SDV[b]	CTLV[c]
Early satsuma mandarin	66.7 (4/6)	100.0 (7/7)	100.0 (5/5)
Yuzu	76.9 (20/26)	100.0 (4/4)	80.0 (12/15)
Shiranuhi	80.0 (4/5)	-	66.7 (2/3)
Total	75.7 (28/37)	100.0 (11/11)	82.6 (19/23)

[a]Citrus tristeza virus; [b]satsuma dwarf virus; [c]citrus tatter leaf virus.

Table 3. Effects of shoot tip size on successful rates of shoot-tip grafting and rates of virus-free plants in citrus tristeza virus

Shoot size	Cultivar	Percentage of successful grafting	Percentage of virus free plant
〈 0.3 mm	Yuzu	16.7 (2/12)	100.0 (2/2)
0.3～0.5 mm	Yuzu	31.8 (7/22)	85.7 (6/7)
0.5~0.7 mm	Yuzu	42.9 (6/14)	66.7 (4/6)

Table 4. Percentage of successful shoot tip culture *in vitro* after heat treatment (40℃/30℃)

Cultivars	Infected Virus	Survival rate (%)
Satsuma mandarin	SDV[a]	48.3 (14/29)
Satsuma mandarin	CTLV[b]	41.1 (30/73)
Yuzu	CTV[c]	74.6 (100/134)
Shiranuhi	CTV	54.5 (12/22)
Early satsuma mandarin (Miyamoto)	CTLV	14.3 (2/14)
Early satsuma mandarin (Iwasagi)	CTLV	13.3 (2/15)

[a]Satsuma dwarf virus; [b]citrus tatter leaf virus; [c]citrus tristeza virus.

서 감귤바이러스를 매개하는 진딧물 등에 의하여 재감염 우려가 상존하고 있다. 따라서 감귤 바이러스 무독묘 육성도 중요하나 앞으로 신품종을 육성 시에는 감귤바이러스에 저항성이 있는 품종을 육성토록 하고, cross-protection에 의한 감귤바이러스 저항성 strain 선발 등 감귤바이러스 피해를 최소화하기 위한 다각적인 연구가 추진되어야 한다.

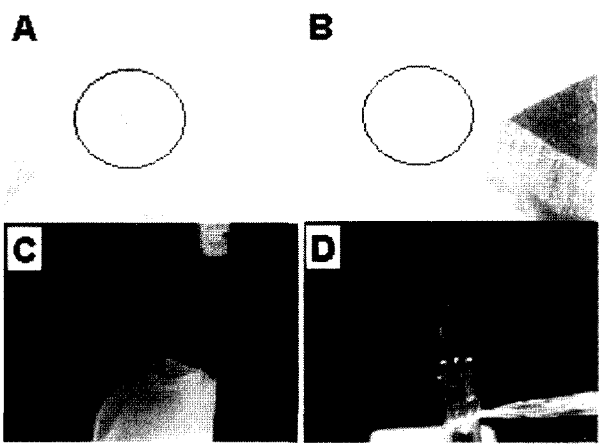

Figure 3. Shoot tip grafting shape for virus-free stock. A and B, the shape of leaf primordia of Yuzu shoot-tip grafted in triangle-hole of trifolate orange rootstock; C, leaves of sprout from Yuzu shoot-tip grafted in triangle-hole of trifolate orange rootstock seedling, 3 weeks after grafting; D, shoot-tip grafted stem-scion (Yuzu/trifoliate orange, 6 weeks after shoot tip grafting) with flush, side-grafted on rough lemon rootstock by banding with stretched parafilm.

적 요

바이러스에 감염된 감귤나무를 생육상에서 주간 40℃, 야간 30℃로 열처리한 후 발생한 신초를 0.3～0.7 mm로 잘라내어 기내에서 치상한 탱자 (*P. trifoliata*) 대목에 접목하는 열처리와 경정접목 (shoot-tip grafting)을 병행한 방법으로 무독묘 생산에 성공하였다. 감귤 바이러스 즉, citrus tristeza virus (CTV), satsuma dwarf virus (SDV) and citrus tatter leaf virus (CTLV) 에 대한 무독화율은 각각 75.7%, 100.0%, 82.6%였다. 경정접목 시 접수크기는 0.3 mm 이하일때 바이러스 무독화율이 높았으나 접목 후 활착율은 저하되었다. 열처리 후 경정배양 (shoot-tip culture)을 하여 1개월 후에 활착율을 조사한 결과 Yuzu (*C. junos*)는 74.6%, 그리고 early satsuma mandarin (Iwasagi)은 13.3%를 나타내었다. 그러나 항바이러스제인 rivabirin을 첨가한 후 무독

효과를 보기 위하여 후대배양 중에 온주밀감의 특성상 갈변되어 고사함으로서 무독묘를 생산하지 못했다.

사 사

본 연구는 농림부 농림기술관리센터의 연구비 지원을 일부 받아 수행되었다 (20010079).

인용문헌

Agrios GN (1988) Plant pathology. Academic Press, London, pp 587-622
Calavan EC, Roistacher CN, Nauer EM (1972) Thermotherapy of citrus inactivation of certain viruses. Plant Dis Rep 56: 976-980
Fawcett HS (1932) New angles on treatment of bark disease of citrus. California Citrograph 17: 406-408
Iwanami T, Hidaka T, Omura M (1993) Shoot-tip culture of citrus (Ⅲ. Elimination of citrus tatter leaf virus from cultured shoots). Bull Fruit Tree Res Stn 24: 61-71
Kim DH, Hyun JW, Hwang HS, Lee SC (2000) RT-PCR detection of citrus tristeza virus from early satsuma mandarin and yuzu in Cheju Island. Plant Pathol J 16: 48-51
Kim DH, Oh DC, Hyun JW, Kwon HM, Kim DH, Lee SC (1999) Incidence of three major citrus viruses in Cheju Island. Plant Dis Agris 5: 34-40
Kwon HM, Koh KD (1985) The survey of citrus viruses infection in Cheju. Research Experiment Report. Jeju-do Agricultural Research & Extension, pp 320-327
Miyakawa T, Yamaguchi A (1981) Citrus Disease in Japan Plant Protection, pp 47-50
Miyakawa T (1983) The growth of the citrus tatter leaf virus free-stock by heat treatment, pp 95-96
Murashige T, Bitters WP, Nauer EM, Roistacher CN, Holliday PB (1972) A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. HortScience 7: 118-119
Omura M, Hidaka T (1993) Shoot tip culture. Bull fruit tree Res stn 24: 61-71
Su H, Chu J (1984) Modified technique of citrus shoot-tip grafting and rapid propagation method to obtain citrus bud woods free of citrus viruses and libukin. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 332-338
Takahara H (1986) Production of the citrus virus free-stock by semi shoot-tip grafting. Bull fruit tree Res Stn 8: 13-24

(접수일자 2005년 1월 26일, 수리일자 2005년 2월 5일)