

## 열처리와 경정배양을 이용한 바이러스 무병 사과 생산 시스템

이건섭<sup>1\*</sup> · 김정희<sup>2\*</sup> · 김현란<sup>3</sup> · 신일섭<sup>1</sup> · 조강희<sup>1</sup> · 김세희<sup>1</sup> · 신주희<sup>1</sup> · 김대현<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 과수과, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 사과시험장

<sup>3</sup>농촌진흥청 미래창조전략팀

### Production System of Virus-free Apple Plants Using Heat Treatment and Shoot Tip Culture

Gunsup Lee<sup>1\*</sup>, Jeong Hee Kim<sup>2\*</sup>, Hyun Ran Kim<sup>3</sup>, Il Sheob Shin<sup>1</sup>, Kang Hee Cho<sup>1</sup>, Se Hee Kim<sup>1</sup>, Juhee Shin<sup>1</sup> and Dae Hyun Kim<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Fruit Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Suwon 440-706, Korea

<sup>2</sup>Apple Research Station, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Gunwi 716-812, Korea

<sup>3</sup>Future & Creation Strategy Team, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

(Received on November 12, 2013; Revised on November 21, 2013; Accepted on November 25, 2013)

In worldwide, viral diseases of apple plants has caused the serious problems like reduced production and malformation of fruits. Also, the damages of apple plants by virus and/or viroid infection (*Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apple stem grooving virus*, *Apple mosaic virus*, and *Apple scar skin viroid*) were reported in Korea. However there is few report about the protection approach against the infection by apple viruses. Therefore, this paper introduced the experimental protocol for the development of virus-free apple cultivars (Danhong, Hongan, Saenara, Summerdream). Apple plants were treated at 37°C for 4 weeks and shoot tips were cultured *in vitro*. After heat treatment, the detection of apple viruses was performed by RT-PCR using virus-specific detection primers in new apple cultivars. With the heat treatments followed by *in vitro* shoot tip culture, the proportion of virus-free stocks of ‘Danhong’, ‘Hongan’, ‘Saenara’, and ‘Summerdream’ was 28%, 16%, 12%, and 12%, respectively. Taken together, this approach can be a good tool for production of virus-free apple stocks.

**Keywords :** *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apple mosaic virus*, *Apple scar skin viroid*, *Apple stem grooving virus*, Heat treatment

## 서 론

사과에 발생하는 바이러스는 대표적으로 *Apple mosaic virus*(ApMV), *Apple chlorotic leaf spot virus*(ACLSV), *Apple stem pitting virus*(ASPV), *Apple stem grooving virus*(ASGV) 등이 있으며, 바이로이드는 *Apple scar skin viroid*

(ASSVd)가 있다. 이러한 바이러스에 감염된 사과의 경우 세력이 서서히 떨어지면서 각종 병해나 환경에 대한 저항력이 약화되고 과실이 작아지는 등 만성적인 피해를 주게 되는데 국내 사과 작물의 경우 20-40%의 생산량이 감소되며 당도 저하가 생기는 것으로 확인되었다(Kim 등, 2011; Kirnard 등, 1996; Liu 등, 2013; Menzel 등, 2002). 각각의 바이러스에 의한 감염증상을 보면 ApMV에 감염된 사과의 경우 연한 노란색의 반점을 형성하고 잎 주위가 갈변되고 성장 피해 및 수량 감소를 가져오며, ASGV의 경우 지표식물을 제외하고는 증상이 크지 않으나 생육저하를 일으킬 수 있다. ASSVd는 과실에 특이적으로

\*Gunsup Lee and Jeong Hee Kim have contributed equally to this work.

\*\*Corresponding author

Phone) +82-31-240-3673, Fax) +82-31-240-3709

Email) kimdh823@korea.kr

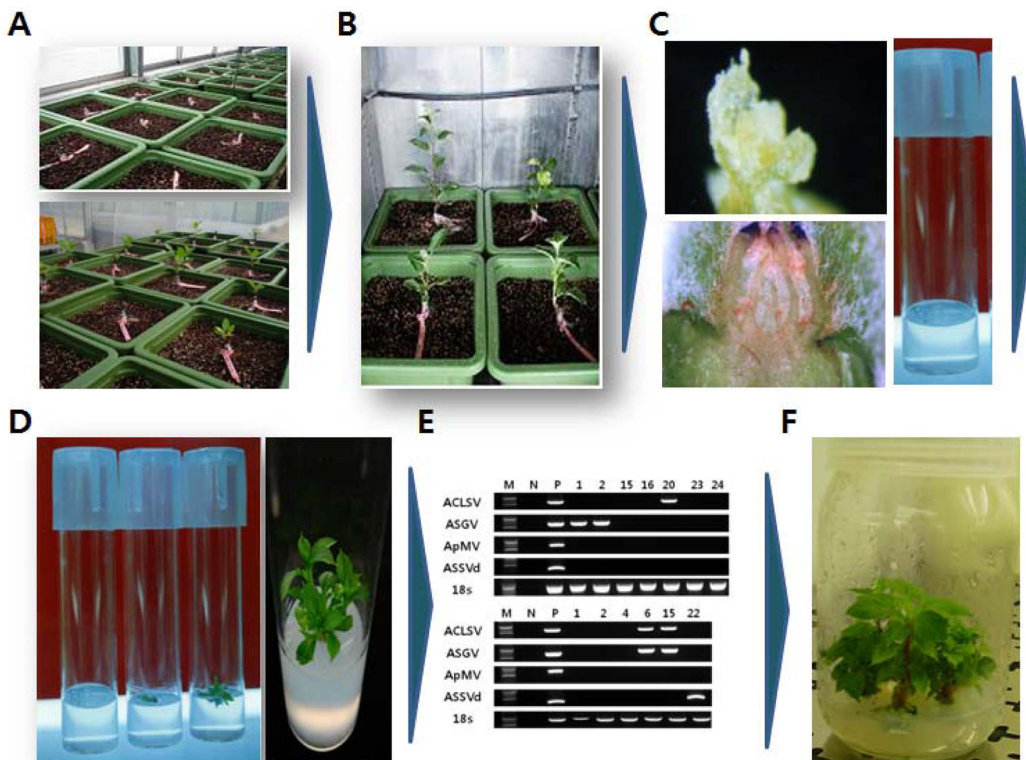
증상을 나타내게 되며 따라서 사과의 품질저하를 일으키게 된다. 사과 바이러스의 전염 방법은 주로 접목에 의한 방법에 의해 감염이 되나 뿌리간의 접촉에 의해서도 감염이 될 수 있으며 ASSVd와 같은 바이로이드의 경우는 전정가위와 같은 물리적인 접촉에 의해서도 감염이 되는 것으로 알려졌다(Arai 등, 1990; Kim 등, 2004; 2010). 이와 같은 사과의 바이러스에 의한 피해는 점점 심화되고 있지만 이에 대한 방제 대책은 신속한 소각 외에는 전무한 상황이며 따라서 사과 무병묘 생산 시스템의 개발은 매우 중요한 사항이다.

사과 작물에서 바이러스를 제거하고 무병묘를 생산하는 연구는 매우 오래전부터 수행되어졌다. 바이러스 무병묘를 생산하는 방법은 37°C로 일정기간 동안 처리하는 열처리 요법(Thermotherapy)과 4°C로 일정기간 처리하는 한냉 요법(Coldtherapy) 그리고 ribavirin과 같은 항바이러스제를 처리하는 화학적인 요법(Chemotherapy)등으로 크게 나눌 수 있다(Feng 등, 2013; Hollings, 1965; Paduch-Cichal과 Kryczynski, 1987; Savitri, 2013). Campbell (1962)은 지표식물(indicator plant)인 *Virginia Crab*, *Spy 227*, *Malus platycarpa* 등이 열처리와 shoot tip 배양에 의해 사과 바이러스가 활성화되지 않는 현상에 대하여 보고

하였으며, Hansen과 Lane(1985)은 *Malus pumila Mill* 사과 품종에 항바이러스제인 ribavirin을 10, 20, 40, 그리고 80  $\mu\text{M}$  농도로 처리함으로써 온실과 농장 모두에 사과 shoot로부터 ACLSV 제거 효과를 확인하였다. 또한 본 연구에서도 *Citrus tristeza virus*, *Satsuma dwarf virus*, *Citrus tatter leaf virus*에 감염된 감귤 품종인 Yuzu와 Shiranuhi 품종을 이용하여 주간 40°C, 야간 30°C로 열처리를 수행함과 동시에 경정접목(shoot-tip grafting) 방법에 의해서 감귤 무병화를 수행한 바 있다(Kim 등, 2005). 본 연구에서는 사과 신품종의 바이러스 무병묘 생산을 위하여 열처리 요법과 경정배양을 이용하여 바이러스 제거 효과와 식물체 생존률을 분석하였다. 또한 사과 작물에 매우 큰 영향을 미치는 대표적인 병원체인 ApMV, ASGV, ACLSV, ASSVd를 RT-PCR로 진단하여 각각의 바이러스에 대한 제거 효율과 사과에서의 무병묘 생산 효율을 확인하였다.

## 재료 및 방법

무병묘 생산을 위한 식물 재료 및 바이러스. 열처리 및 경정배양을 통한 바이러스 무병묘 시스템을 개발하기



**Fig. 1.** Production process of virus-free apple plants using the thermotherapy and shoot tip culture. **A:** Selection of new cultivars, **B:** Heat treatment (37°C), **C:** Shoot-tip culture, **D:** *In vitro* culture, **E:** Selection of virus-free plant by RT-PCR, **F:** Culture of virus-free plant.

위하여 사용된 사과의 품종은 농촌진흥청 사과시험장으로부터 제공받은 ‘단홍’, ‘홍안’, ‘새나라’, ‘썸머드림’ 4개의 신품종이다. 열처리 및 경정배양의 바이러스 제거효과를 구명하기 위하여 각 품종별로 3가지 바이러스(ACLSV, ASGV, ASSVd)에 대부분 감염되어 있는 25개체를 선발하였다. 최종적으로 생산된 식물체에 대하여 바이러스 3종(ApMV, ASGV, ACLSV)과 바이로이드 1종(ASSVd)을 진단하여 무병묘 여부를 확인하였다.

**사과 신품종의 배양과 열처리 수행.** 상주 묘목센터에서 미리 육묘되어 준비된 M9 대목에 무병묘 생산을 위한 네 가지 신품종 접수를 이용하여 가지접을 하였으며 접수가 15–30 cm 정도 성장할 때 까지 약 2개월 동안 28°C가 유지되는 온실에서 육묘하였다. 육묘 후 무병묘 생산을 위해 접목된 각각의 품종은 37°C가 유지되는 항온 항습장치에서 4주간 열처리 과정을 수행하였다(Fig. 1A, 1B).

**경정배양과 기내도입.** 열처리를 통해 획득된 shoot-tip의 생장점 부위를 약 2–3 mm 크기로 잘라내어 기내도입 배지에 치상하였다. 기내도입 배지의 조성은 MS배지 11에 BA 2 mg, sucrose 30 g, plant agar 8 g을 첨가하여 pH 5.8로 조정 후 사용하였다. 약 4주 동안 기내 도입배지에서 경정배양 후 각 품종들은 잎과 신초가 생성되며 생성된 각 품종들은 사과 증식배지에 옮겨졌다. 사과 증식배지를 통해 안정화된 사과 품종들은 4–8주간 기내 배양을 통해 증식되었다. 여기에서 사용된 증식배지에는 MS 배지 11에 BA 1 mg, IBA 0.3 mg, GA<sub>3</sub> 0.5 mg, sucrose 30 g, plant agar 8 g을 첨가하였으며, pH는 기내 도입배지

와 같이 5.8로 조정 후 사용하였다(Fig. 1C, 1D).

**RNA 분리 및 RT-PCR을 통한 바이러스 및 바이로이드 진단.** 사과 증식배지에 배양된 각 품종의 사과에서 바이러스 진단을 위해 CTAB method를 통해 total RNA를 분리하였다(Gambino 등, 2008). 확보된 total RNA는 M-MLV kit(Invitrogen)을 이용해 cDNA를 합성하였으며, Table 1에 언급한 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. ApMV와 ASSVd 진단을 위한 PCR 증폭 반응은 10X reaction buffer 2 µl, 2.5 mM dNTPs 2 µl, Taq DNA polymerase 0.3 µl, cDNA 1 µg를 혼합하여 수행하였고 반응 조건은 94°C에서 40초, 60°C에서 40초 그리고 72°C에서 40초씩 각각 35 사이클을 수행하였다. ASGV와 ACLSV 경우는 annealing 온도를 65°C로 하여 진단하였다(Fig. 1E, 1F). 또한 total RNA 및 cDNA 합성이 온전히 이루어짐을 확인하기 위해 18s 유전자를 이용하여 65°C의 annealing 온도로 PCR을 수행하였다.

## 결과 및 고찰

**사과 신품종의 바이러스 진단.** 사과 무병화 시스템을 구축함에 앞서 바이러스가 감염된 사과 묘목을 확보하였다. 농촌진흥청 사과시험장으로부터 분양받은 사과 신품종의 경우 RT-PCR 진단 방법을 통해 바이러스의 유무를 확인해 본 결과 ACLSV, ASGV, ASSVd의 경우 대부분의 신품종에서 복합감염되어 있었다. 단홍, 새나라, 썸머드림의 경우 ACLSV, ASGV, ASSVd가 복합 감염된 라인을 확보할 수 있었으며, 홍안의 경우는 ACLSV, ASGV

**Table 1.** Primer pairs and expected size of RT-PCR products for the detection of apple-infecting viruses and viroid<sup>a</sup>

Targets	Primer	Sequence (5' → 3')	PCR products	Originated accession No.
ACLSV <sup>b</sup>	Upstream	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA	702 bp	KC935956
	Downstream	AGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA		
ASGV <sup>c</sup>	Upstream	ATGAGTTTGGAAGACGTGCTTCAA	714 bp	JX885581
	Downstream	CTAACCCCTCCAGTTCCAAGTTACT		
ApMV <sup>d</sup>	Upstream	TCAACATGGTCTGCAAGTAC	669 bp	FN546183
	Downstream	CTAACAAATCTTCATCGATAA		
ASSVd <sup>e</sup>	Upstream	CCCGTAAACACCGTGCGGT	335 bp	JX860405
	Downstream	ACCGCGAAACACCTATTGTG		
18S <sup>f</sup>	Upstream	CGCATCATTCAAATTTCTGC	843 bp	DQ341382
	Downstream	TTCAGCCTTGCGACCATACT		

<sup>a</sup>The primers for each virus were designed as species-specific.

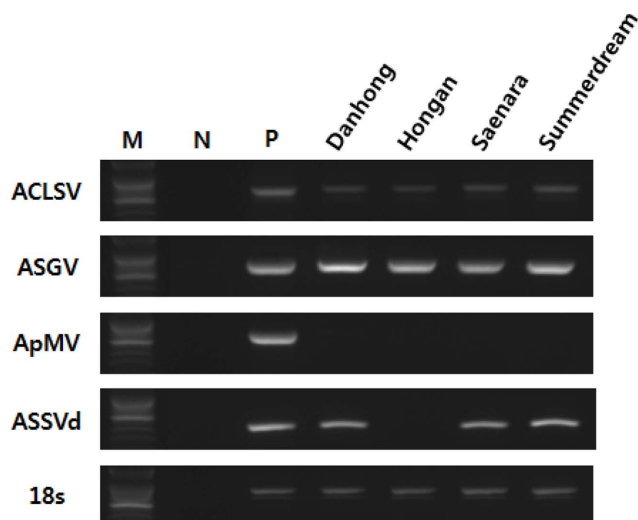
<sup>b</sup>ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*.

<sup>c</sup>ASGV: *Apple stem grooving virus*.

<sup>d</sup>ApMV: *Apple mosaic virus*.

<sup>e</sup>ASSVd: *Apple scar skin viroid*.

<sup>f</sup>18S: 18s ribosomal RNA.



**Fig. 2.** Detection of apple viruses in new apple cultivars. Apple viruses were detected by RT-PCR method in new apple cultivars. N: negative, P: positive. ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*, ApMV: *Apple mosaic virus*, ASSVd: *Apple scar skin viroid*. 18S: 18s ribosomal RNA.

**Table 2.** The survival and virus elimination rates of apple cultivar treated with heat treatment *in vitro*

Apple cultivar	Grafting	Heat treatment	Virus detection
	Survival rate <sup>a</sup>	Survival rate <sup>a</sup>	Elimination rate <sup>b</sup>
Danhong	96% (24/25)	41.7% (10/24)	28% (7/25)
Hongan	100% (25/25)	28% (7/25)	16% (4/25)
Saenara	96% (24/25)	25% (6/24)	12% (3/25)
Summerdream	92% (23/25)	33.3% (8/23)	12% (3/25)

<sup>a</sup>The numbers in parentheses refer to numbers of survival plants/numbers of samples.

<sup>b</sup>The number in parentheses refer to number of virus-free plants/numbers of total samples.

가 복합 감염된 라인을 진단하였다. 따라서 열처리 및 경정배양을 통한 무병화가 가능한지 확인해 보기 위하여 최대한 많은 바이러스의 종류가 감염된 라인을 선별하여 각 품종별로 25개체의 접수 묘목을 확보하였다(Fig. 2).

**사과 식물체의 열처리 및 경정배양.** Hollings(1965)은 열처리 수행 시 바이러스 활성보다 식물의 성장속도가 더 왕성한 점을 이용하여 무병주를 생산할 수 있음을 보고 하였으며, 따라서 사과 신품종에서도 열처리 방법을 이용하여 무병화를 시도하였다. 각각의 신품종 25개체를 선별하여 접목을 수행하였으며, 홍안은 100%, 단홍과 새나라는 96% 그리고 썸머드림은 92%의 접목 성공률을 확인하였다. 접목 후 15–30 cm 정도 성장한 사과를 이용하여 열처리를 하였다. 열처리 시간은 4주, 6주, 8주 단위로 실

시하였으나 모든 결과에서 큰 차이를 확인하지 못하였으며, 따라서 식물체에 큰 영향이 없고 안정적인 4주를 기준으로 열처리 하였다. 열처리 과정과 경정배양을 통한 기내 도입 과정 중 shoot tip의 생존률은 단홍 41.7%, 홍안 28%, 새나라 25%, 썸머드림 33.3%의 낮은 생존률을 확인할 수 있었으며, 생존 개체에서도 잎의 대부분이 소실되는 현상을 관찰하였다(Table 2). Papstein 등(2008)은 사과에서 열처리를 수행한 결과 40–60%의 낮은 생존률을 보고하였는데, 본 연구의 실험 결과도 유사한 생존률을 확인할 수 있었으며, 열처리 요법의 경우 바이러스뿐만 아니라 식물체 자체에도 많은 부정적 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 열처리된 사과 품종은 기내에 도입하기 위해 생장점인 눈 부위를 약 2 mm씩 잘라내어 사과 기내 도입배지에 치상을 하였고, 약 한 달간 배양 후 증식 배지에 옮겨졌다.

**열처리 및 경정배양을 통한 바이러스 제거 효과.** 증식 배지로 옮겨진 열처리된 사과 품종들은 4–8주간 *in vitro* 에서 배양되어진 후 RT-PCR 방법에 의하여 바이러스를 진단하였다. 열처리와 경정배양 후 생존한 신품종들의 바이러스 제거 효율을 확인해 본 결과 ACLSV의 경우 총 31개체 중 26개체로 84%의 제거 효율을 확인할 수 있었으며, ASGV의 경우는 31개체 중 21개체로 68%, ASSVd는 24개체 중 20개체로 83%의 바이러스 제거 효율을 확인할 수 있었다(Table 3). 또한 각 신품종에 의한 바이러스 무병묘 최종생산은 단홍의 경우 열처리 후 생존한 10개체 중 7개체에서 무병묘를 확인하였으며, 홍안은 7개체 중 4개체, 새나라는 6개체 중 3개체 그리고 썸머드림은 8개체 중 3개체를 각각 확인할 수 있었다(Fig. 3). 위에서 언급한 결과와 같이 열처리 후 생존한 개체에서는 높은 바이러스 제거 효율을 확인할 수 있었지만 접목, 열처리 및 경정배양을 수행하는 과정에서 생존률이 많이 감소하는 현상이 나타났으며, 최종적으로는 12–28%의 무병묘를 획득할 수 있었다.

El-Dougdoug 등(2010)은 한냉 처리 요법과 화학적 처리 요법을 동시에 사용하여 복숭아와 배 작물에 무병묘 생산을 보고하였다. 이 논문에서는 열처리 요법과 한냉 처리 요법을 각각 처리한 군과 한냉 처리와 화학적 처리 요법을 동시에 수행한 군을 비교하여 바이러스 제거 효율을 보고하였으며, 열처리 요법의 경우 바이러스 제거가 가장 어려웠고 한냉 처리와 화학적 처리 요법을 동시에 수행한 군에서는 약 40% 이상의 무병묘를 확보하였다. 따라서 더욱 효과적인 무병묘 생산 시스템 개발하기 위해서는 열처리와 경정배양 이외에도 한냉 처리와 화학적 처리를 포함하는 추가적인 연구를 계속 수행하여야 할 것이다.

**Table 3.** Effect of virus elimination by heat treatment and shoot-tip culture in apple cultivars

Cultivars	Before heat treatment and shoot-tip culture			After heat treatment and shoot-tip culture		
	ACLSV <sup>a</sup>	ASGV <sup>b</sup>	ASSVd <sup>c</sup>	ACLSV <sup>a</sup>	ASGV <sup>b</sup>	ASSVd <sup>c</sup>
Danhong1	+	+	+	-	-	-
Danhong2	+	+	+	-	-	-
Danhong4	+	+	+	-	-	-
Danhong5	+	+	+	-	-	-
Danhong6	+	+	+	-	-	-
Danhong7	+	+	+	-	-	-
Danhong8	+	+	+	-	-	-
Danhong10	+	+	+	+	-	-
Danhong15	+	+	+	-	+	+
Danhong17	+	+	+	-	+	-
Hongan1	+	+	-	-	+	-
Hongan2	+	+	-	-	+	-
Hongan15	+	+	-	-	-	-
Hongan16	+	+	-	-	-	-
Hongan20	+	+	-	+	-	-
Hongan23	+	+	-	-	-	-
Hongan24	+	+	-	-	-	-
Saenara1	+	+	+	-	-	-
Saenara2	+	+	+	-	-	-
Saenara4	+	+	+	-	-	-
Saenara6	+	+	+	+	+	-
Saenara15	+	+	+	+	+	-
Saenara22	+	+	+	-	-	+
Summerdream1	+	+	+	+	-	-
Summerdream3	+	+	+	-	-	-
Summerdream5	+	+	+	-	-	-
Summerdream6	+	+	+	-	-	-
Summerdream8	+	+	+	-	+	+
Summerdream9	+	+	+	-	+	-
Summerdream18	+	+	+	-	+	+
Summerdream24	+	+	+	-	+	-

Virus infections were evaluated by RT-PCR. +: positive reaction, -: negative reaction.

<sup>a</sup>ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*.

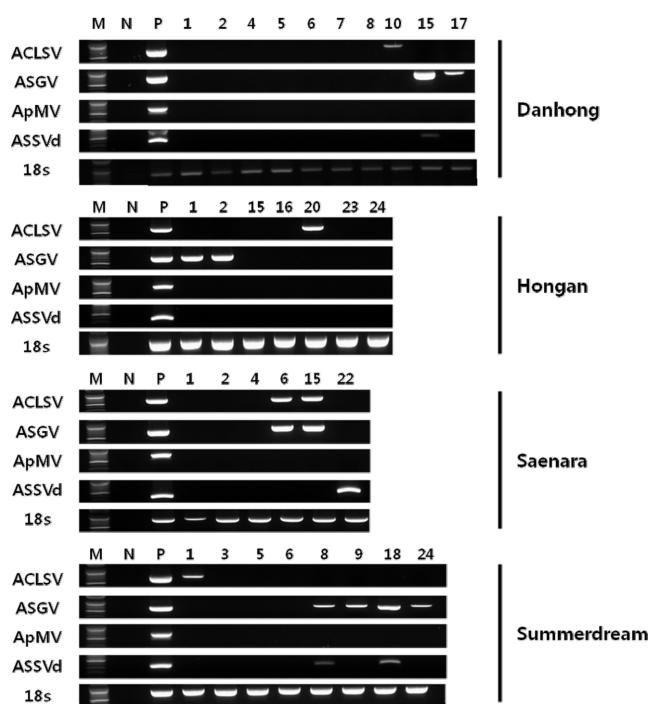
<sup>b</sup>ASGV: *Apple stem grooving virus*.

<sup>c</sup>ASSVd: *Apple scar skin viroid*.

## 요 약

국내외적으로 ACLSV, ASGV, ApMV, ASSVd와 같은 바이러스 및 바이로이드 병의 발생으로 사과 과실의 생산량 감소와 기형적인 외형 등 많은 문제점들이 보고되었다. 하지만 사과 바이러스의 감염에 대한 방제 대책은 거의 알

려진 바가 없는 실정이다. 따라서 본 논문에서는 사과 신품종인 ‘단홍’, ‘홍안’, ‘새나라’, ‘썸머드림’을 분양하기에 앞서 바이러스 무병묘를 생산하는 시스템을 확립하고자 하였다. 37°C가 유지되는 항온 항습장치에서 4주간 열처리를 하였으며 기내에서 경정 배양을 하였다. 열처리된 각각의 사과 신품종들은 바이러스 진단 프라이머를 통해



**Fig. 3. Identification of virus-free new apple cultivars.** After heat treatment and shoot tip culture, virus-free apple plants were verified by RT-PCR method. N: negative, P: positive. ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*, ApMV: *Apple mosaic virus*, ASSVd: *Apple scar skin viroid*. 18S: 18s ribosomal RNA.

RT-PCR을 수행하여 바이러스 진단을 수행하였다. 결과적으로 ‘단홍’은 28%의 바이러스 무병묘를 확보할 수 있었으며 ‘홍안’은 16%, ‘새나라’와 ‘썸머드림’은 12%의 확률로 바이러스 무병 사과를 확보할 수 있었다. 본 연구결과는 열처리 및 경정배양을 통해 사과 신품종에서 바이러스 무병묘 생산 시스템 구축이 가능함을 보여주었다.

### Acknowledgement

This work was supported by Rural Development Administration (Project No. PJ006358), Suwon, Republic of Korea.

### References

- Arai, S., Fukushima, C., Nakazawa, N. and Segawa, K. 1990. Susceptibility of apple root stock infected with *apple chlorotic leaf spot virus* to white root rot and violet root rot. *Annu. Rep. Soc. Plant Protect. N. Jpn.* 41: 92–93.
- Campbell, A. I. 1962. Apple virus inactivation by heat therapy and tip propagation. *Nature* 195: 520.
- El-DougDoug, K. A., Osman, M., Abdelkader, H. S. and Dawoud, R. A. 2010. Elimination of *Hop stunt viroid* (HSVd) from infected peach and pear plants using cold therapy and chemotherapy. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 4: 54–60.
- Feng, C., Wang, R., Li, J., Wang, B., Yin, Z., Cui, Z., Li, B., Bi, W., Zhang, Z., Li, M. and Wang, Q. 2013. Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of in vitro-Grown shoot tips. *Methods Mol. Biol.* 994: 463–482.
- Gambino, G., Perrone, I. and Gribaudo, I. 2008. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem. Anal.* 19: 520–525.
- Hansen, A. and Lane, W. 1985. Elimination of *apple chlorotic leaf spot virus* from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Dis.* 69: 134–135.
- Hollings, M. 1965. Disease control through virus-free stock. *Annu. Rev. Phytopathol.* 3: 367–396.
- Kim, D. H., Kim, H. R., Heo, S., Kim, S. H., Kim, M. A., Shin, I. S., Kim, J. H., Cho, K. H. and Hwang, J. H. 2010. Occurrence of *Apple scar skin viroid* and relative quantity analysis using real-time RT-PCR. *Res. Plant Dis.* 16: 247–253. (In Korean)
- Kim, D. H., Shim, H. K., Kwon, H. M., Hyun, J. W., Kim, K. S., Lee, J. K. and Lee, S. C. 2005. Production of virus-free stocks from citrus plant by the shoot-tip grafting and heat treatment. *Korean J. Plant Biotech.* 32: 45–50.
- Kim, H. R., Kim, J. S., Hwang, J. H., Lee, S. H., Choi, G. S. and Choi, Y. M. 2004. Influence of ACLSV-infection on fruit quality of “Hongro” apples. *Res. Plant Dis.* 10: 145–149. (In Korean)
- Kim, J. S., Lee, S. H., Choi, H. S., Kim, M. K., Kwak, H. R., Nam, M., Kim, J. S., Choi, G. S., Cho, J. D., Cho, I. S. and Chung, B. N. 2011. Occurrence of virus diseases on major crops in 2010. *Res. Plant Dis.* 17: 334–341. (In Korean)
- Kinard, G., Scott, S. and Barnett, O. 1996. Detection of *apple chlorotic leaf spot* and *apple stem grooving viruses* using RT-PCR. *Plant Dis.* 80: 616–621.
- Liu, P., Zhang, L., Zhang, H., Jiao, H. and Wu, Y. 2013. Detection and molecular variability of *Apple stem grooving virus* in Shaanxi, China. *J. Phytopathol.* 161: 445–449.
- Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods* 99: 81–92.
- Paduch-Cichal, E. and Kryczynski, S. 1987. A low temperature therapy and meristem-tip culture for eliminating four viroids from infected plants. *J. Phytopathol.* 118: 341–346.
- Papstein, F., Sedlak, J., Polak, J., Svobodova, L., Hassan, M. and Bryxiova, M. 2008. Results of in vitro thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell Tiss. Org.* 94: 347–352.
- Savitri, W. D., Park, K. I., Jeon, S. M., Chung, M. Y., Han, J. S. and Kim, C. K. 2013. Elimination of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) from meristem tip culture combined with prolonged cold treatment. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 54: 177–182.