

## 전라남도 지역 감 바이로이드의 감염상황 및 무병화 효율 연구

김대현 · 김인수 · 이건섭 · 조인숙 · 조강희 · 신일섭 · 김세희 · 천재안 · 최인명

### Current occurrence of persimmon viroid and citrus viroid in persimmon in JellaNam-do and testing for viroid inactivation methods

Dae Hyun Kim · In-Soo Kim · Gunsup Lee · In-Sook Cho · Kang Hee Cho · Il Sheob Shin · Se Hee Kim · Jae An Chun · In-Myung Choi

Received: 9 March 2015 / Revised: 20 March 2015 / Accepted: 20 March 2015  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** It is a serious situation that the farmers' income has gradually decreased due to the decline of productivity of fruit trees infected with viroids. It has been known that *Persimmon viroid* (PVd) and *Citrus viroid* (CVd) are economically important viroids that can infected persimmon. In this study, the incidence of CVd and PVd in 'Fuyu' persimmon were identified as 41% and 34% in JeollaNam-do, respectively. The collected persimmon samples infected by both PVd and CVd were used for testing efficiency of the viroid inactivation methods. The samples were subjected to single treatment of the heat treatment (37°C), cold treatment (4°C), or antiviral agent treatment (Ribavirin), and double treatment of combinations of the three methods. Viroid inactivation efficiency was confirmed through RT-PCR. In the case of the samples subjected to cold treatment for 4 weeks, the viroid inactivation efficiency was most significantly high as 67% against the survival rate of 100%. In addition, in the case of the samples treated for 2 weeks with the antiviral agents and cold

treatment, the viroid inactivation rate was similar to that of the cold treatment. In conclusion, the cold treatment showed the highest viroid inactivation efficiency, and this result will provide valuable information for production of viroid-free persimmon.

**Keywords** Antiviral agents, Citrus viroid, Cold treatment, Heat treatment, Persimmon viroid

#### 서론

감은 매우 중요한 과수 작물 중 하나로 농림축산식품부 통계자료에 따르면 2000년대에 들어 전체 감 생산면적은 약 3.1만 ha, 생산량은 28만톤으로 전 세계적으로 중국에 이어 두 번째로 많이 재배되고 있다. 그러나 감의 병해충 연구 특히, 바이러스 및 바이로이드에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 감에 감염되는 대표적인 바이로이드는 *persimmon viroid*(PVd)와 *citrus viroid*(CVd) 등이 존재하는 것으로 알려져 있다(Ito et al. 2013; Nakaune and Nakano 2008). 일반적으로 알려진 감 바이로이드 증상은 잎에 검은 반점 및 얼룩이 생성되거나 과실의 괴사 반점, 줄기 및 가지의 검은색 얼룩 등이 있으나 아직까지는 이러한 증상에 의한 피해가 어느 정도인지 구체적인 자료가 없는 실정이다(Morton 1987). 사과에 감염이 가능한 바이로이드인 ASSVd(*Apple Scar Skin Viroid*)의 경우 과피 얼룩 반점 및 코르크화 반점 등의 증상을 유발하며, 수확기에 과피 전체의 50% 이상이 노란색 반점들로 덮여 착색이 불균일하고 정상과에 비해 크기가 작아지는 등 상품성을 잃는 것으로 보고되었다(Kim et al. 2010). 감 또한

D. H. Kim · I.-S. Kim · G. S. Lee · K. H. Cho (✉)  
· S. H. Kim · J. A. Chun · I.-M. Choi  
농촌진흥청 국립원예특작과학원 과수과  
(Fruit Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Wanju 565-852, Korea)  
e-mail: khc7027@korea.kr

I.-S. Cho  
농촌진흥청 국립원예특작과학원 원예특작환경과  
(Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Wanju 565-852, Korea)

I. S. Shin  
농촌진흥청 국립원예특작과학원 배연구소  
(Pear Research Institute, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Naju 520-821, Korea)

과실에 바이로이드에 의한 증상이 보고되고 있는 만큼 근본적인 감염률 조사 및 바이로이드 무병묘 생산 연구가 반드시 수행되어야 할 것으로 판단된다.

과수에서 바이러스 및 바이로이드를 제거하고 무병묘를 생산하는 연구는 매우 다양한 방법으로 수행되었다. 무병묘를 생산하는 방법은 38°C로 일정기간 동안 처리하는 열처리 요법(Thermotherapy)과 4°C로 일정기간 처리하는 한냉 요법(Coldtherapy), 그리고 ribavirin과 같은 항바이러스제를 처리하는 화학적인 요법(Chemotherapy) 등으로 나눌 수 있다(Feng et al. 2013; Hollings 1965; Paduch-Cichal and Kryczynski 1987; Savitri et al. 2013). Campbell(1962)은 *Virginia Crab*, *Spy 227*, *Malus platycarpa* 등이 열처리와 경정 배양에 의해 바이러스가 제거됨을 확인하였다. Papstein 등(2008)은 사과 품종인 Idared와 Sampion을 이용하여 열처리를 통해 실험한 결과 Idared는 바이러스가 제거되었지만 Sampion은 제거되지 않았다. 따라서 품종에 따라 무병화 함에 있어서 처리 방법에 차이가 있음을 보여 주었다. Paduch-Cichal과 Kryczynski(1987)는 한냉처리에 의해 PSTVd(*Potato Spindle tuber viroid*)의 제거 효과를 보여주었으며, Hansen과 Lane(1985)은 *Malus pumila* Mill 사과에 항바이러스제(ribavirin)를 10, 20, 40, 그리고 80  $\mu\text{M}$  농도로 처리함으로써 온실과 과수원에 식재되어 있는 사과 신초에서 ACLSV(*Apple Chlorotic Leaf Spot Virus*) 제거 효과를 확인하였다. 또한 국립원예특작과학원에서 *Citrus tristeza*

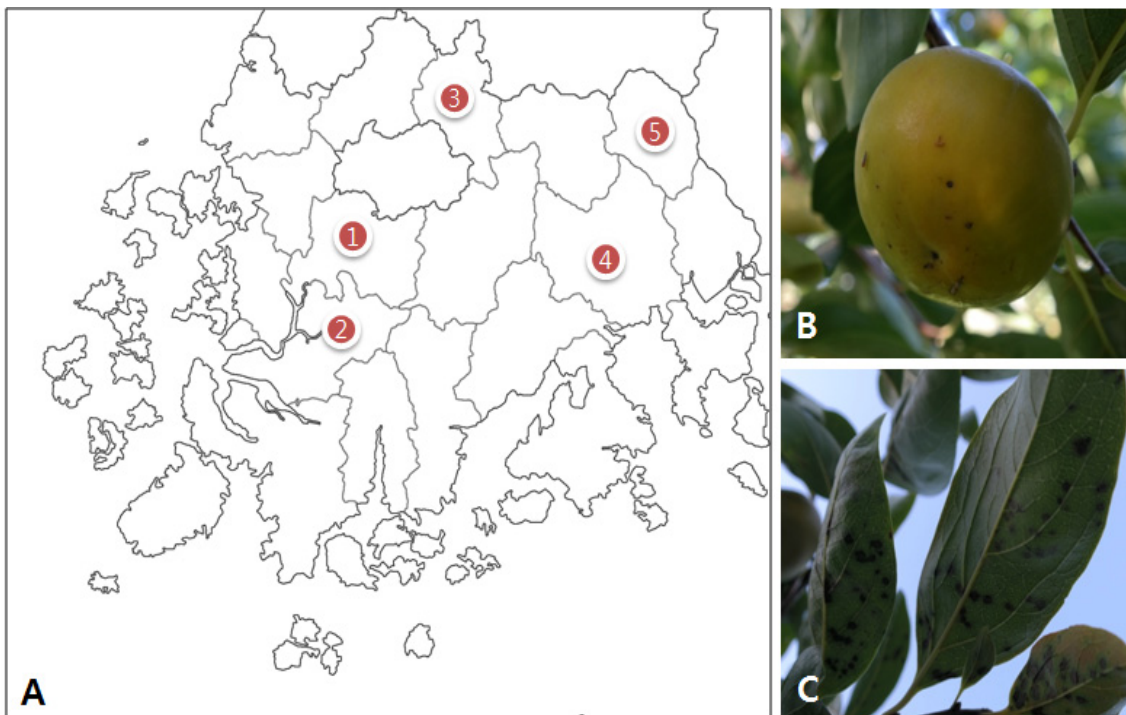
*virus*, *Satsuma dwarf virus*, *Citrus tatter leaf virus*에 감염된 감귤 품종을 이용하여 열처리와 경정접목(shoot-tip grafting) 방법에 의해서 감귤 무병화를 수행한 바 있으며(Kim et al. 2005), 사과에서도 *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apple stem grooving virus*, *Apple mosaic virus*와 *Apple scar skin viroid*에 대해 열처리 및 경정 배양에 의한 무병화 실험을 확보하였다(Lee et al. 2013).

본 연구에서는 전라남도 지역 단감 재배 농가에서 수집한 부유 품종을 이용하여 바이로이드 감염 현황을 파악하였고, 확보된 CVd와 PVd가 동시에 감염된 감 식물체의 무병화를 수행하였다. 또한 바이로이드 감염이 확인된 감 식물체를 이용하여 열처리, 한냉처리 및 항바이러스제 처리를 통하여 무병화 효율 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시험재료

감 바이로이드 감염률을 조사하기 위해 전라남도 5지역(나주, 영암, 담양, 순천, 구례)의 20농가를 선정하였다. 시료는 바이로이드 진단 효율을 높이기 위하여 6월에 198개체의 단감 부유 품종의 신초 부위에서 잎을 채취하여 실험에 이용하였다(Fig. 1).



**Fig. 1** Sampling locations in Jeollanam-do and representative symptoms appeared in persimmon infected by citrus viroid and persimmon viroid. A. Locations ①: Naju, ②: Yeongam, ③: Damyang, ④: Suncheon, ⑤: Gurye B. Viroid symptom in fruit. C. Viroid symptom in leaf

**Table 1** Primer pairs used for detection of persimmon-infecting viroids<sup>a</sup> and expected sizes of RT-PCR products

Target	Primer	Sequence (5' → 3')	PCR product (bp)	Originated accession No.
CVd <sup>b</sup>	Upstream	CGACAGGTGAGTCTCCTTGC	336	AB019508
	Downstream	TCGTCGACGAAGGCATGTGA		
PVd <sup>c</sup>	Upstream	CGGCAGGGAGCCTTGCGAAC	396	NC_010308
	Downstream	AGCTCGGGGCTGGAGCTTGG		
18S <sup>d</sup>	Upstream	CGCATCATTCAAATTTCTGC	843	DQ341382
	Downstream	TTCAGCCTTGCGACCATACT		

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

<sup>b</sup>CVd: *Citrus viroid*.

<sup>c</sup>PVd: *Persimmon viroid*.

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

**RNA 분리 및 RT-PCR을 통한 바이로이드 진단**

채취한 단감의 신초를 이용하여 바이로이드 진단을 위해 CTAB 방법을 통해 total RNA를 분리하였다(Gambino et al. 2008). 확보된 total RNA는 M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용해 cDNA를 합성하였으며, Table 1에 언급한 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. CVd 진단의 경우 PCR 증폭은 총 20 µL의 반응액에 cDNA 50 ng, 1×PCR buffer, 250 µM dNTPs, 1.5 units *Ex Taq* DNA polymerase(TaKaRa, Tokyo, Japan)를 혼합하여 수행하였고 반응 조건은 94°C에서 40초, 60°C에서 40초 그리고 72°C에서 40초씩 각각 35회 반복하였다. PVd의 경우는 위의 조건에 extension 시간을 20초 단축하여 진단하였다. 또한 total RNA 및 cDNA가 완전히 합성이 확인하기 위해 18s 유전자를 이용하여 65°C의 annealing 온도로 PCR을 수행하였다.

**경정배양과 기내도입**

바이로이드 진단 후 무병화 효율을 확인하기 위해 2종류의 바이로이드가 모두 감염된 감 시료를 이용하여 경정배양을 통해 기내 도입을 수행하였다. 신초의 성장점 부위를 약 5 mm 크기로 잘라내어 기내도입 배지에 치상하였다. 기내도입 배지의 조성은 MS배지 1 L에 BA 2 mg, sucrose 30 g, plant agar 8g을 첨가하여 pH 5.8로 조정한 후 사용하였다. 약 4주 동안 기내 도입배지에서 경정배양 후 잎과 신초가 생성되면 바이로이드 감염묘를 증식배지에 옮겨다. 증식배지는 MS 배지 1 L에 BA 1 mg, IBA 0.3 mg, GA<sub>3</sub> 0.5 mg, sucrose 30 g, plant agar 8 g을 첨가하였으며, pH는 기내 도입배지와 같이 5.8로 조정한 후 사용하였다. 또한 RNA 추출 및 RT-PCR을 통해 감염여부를 확인하였다.

**열처리, 한냉처리 및 항바이러스제 처리에 의한 무병화 효율 실험**

CVd 및 PVd 감염이 확인된 감 부유 품종을 이용하여 열

처리, 한냉처리 및 항바이러스제 처리에 의한 방법을 통하여 무병화 효율 실험을 수행하였다. 5 cm 길이로 배양된 감 신초를 이용하여 각 그룹별 9개의 개체를 확보하여 실험하였다. 열처리와 한냉처리는 각각 38°C와 4°C가 유지되는 항온 항습 장치에서 처리하였으며 항바이러스제 처리군은 ribavirin을 배지에 20 ppm과 40 ppm의 농도로 첨가하여 28°C에서 처리하였다. 또한 열처리와 항바이러스제를 복합적으로 처리한 그룹과 한냉처리와 항바이러스제를 복합처리한 그룹으로 나누어 처리하였으며, 처리기간은 각각 2주, 4주, 8주였다. 각 시기 및 처리별 그룹들은 성장점 배양과 기내증식을 통해 증식하였고 약 8주 후에 RNA 추출과 RT-PCR을 이용하여 바이러스 진단을 하였다.

**결과 및 고찰**

**바이로이드 감염상황**

전라남도 지역에서 수집한 단감 198개체의 바이로이드 진단은 RT-PCR을 이용하였다. CVd는 나주지역에서 수집한 10개체 중 8개체가 감염됨에 따라 80%의 높은 감염

**Table 2** Incidence of *Persimmon viroid* (PVd) and *Citrus viroid* (CVd) on persimmon in Jeollanam-do

Region	Viroid infection rate (%)		
	CVd <sup>a</sup>	PVd <sup>b</sup>	CVd+PVd
Naju	8/10 (80%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)
Yeongam	26/38 (68%)	7/38 (18%)	5/38 (13%)
Damyang	20/50 (40%)	10/50 (20%)	7/50 (14%)
Suncheon	22/50 (44%)	30/50 (60%)	17/50 (34%)
Gurye	5/50 (10%)	19/50 (38%)	3/50 (6%)
In Total	81/198 (41%)	67/198 (34%)	33/198 (17%)

<sup>a</sup>CVd: *Citrus viroid*.

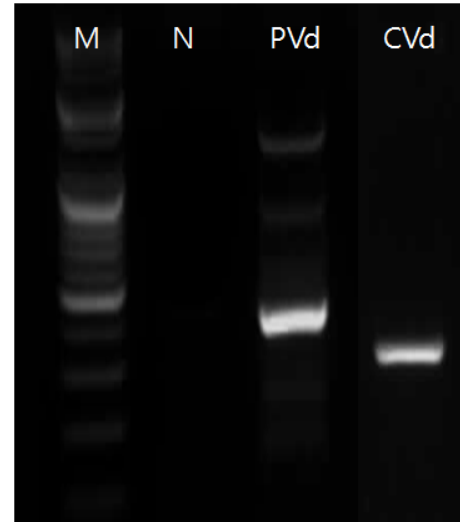
<sup>b</sup>PVd: *Persimmon viroid*.

를을 보였고, 영암은 38개체 중 26개체(68%), 담양은 50개체 중 20개체(40%), 순천은 50개체 중 22개체(44%), 마지막으로 구례는 50개체 중 5개체로 10%의 가장 낮은 감염률을 나타냈다. PVd의 경우 나주지역은 10%의 감염률을 나타냈고, 영암 18%, 담양 20%, 순천 60%, 구례지역은 38%의 감염률을 확인할 수 있었다. 두 종류의 바이로이드가 복합적으로 감염되어 있는 경우는 나주 10%, 영암 13%, 담양 14%, 순천 34%, 구례 6%로 확인되었다(Table 2). 농촌진흥청의 2013년 보고서에 의하면 경상남도의 경우 총 227개체의 단감을 확인한 결과 CVd는 7.1%, PVd는 1.7%의 감염률을 보고하였으나, 전라남도의 경우 높은 바이로이드 감염률을 나타냈다. 이는 접수를 이용해 증식되는 과수의 특성상 지역적으로 편중되는 현상이 관찰되는 것으로 판단되었다.

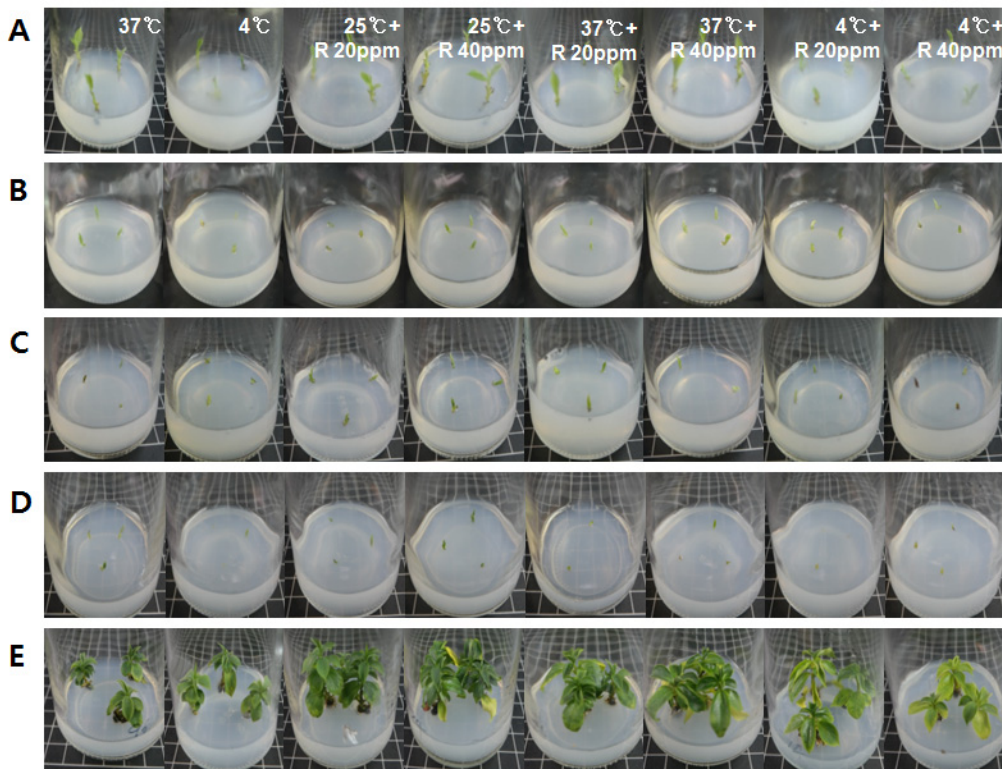
바이로이드 진단 결과를 기준으로 하여 과실 및 잎에서 바이로이드 증상을 확인해 본 결과 검은 반점의 증상 및 잎이 말리는 바이로이드 의심 증상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B, 1C). Morton(1987)은 감 바이로이드 증상으로 잎에 검은 반점이 나타나거나 과실에 괴사 반점이 발생하는 것을 보고한 바 있다. 따라서, 본 연구에서 관찰된 병징은 바이로이드 증상으로 파악하고 있으나 금후 정확한 감 바이로이드 관련 증상 연구를 수행할 예정이다.

#### 단감의 무병화 효율

두 종류의 바이로이드에 대해 복합 감염된 감을 경정배양하였고 바이로이드 진단 결과 기내증식된 감 식물체는



**Fig. 2** Detection of citrus viroid and persimmon viroid in persimmon PVd and CVd were detected by RT-PCR method in persimmon plants. N: negative, PVd: *Persimmon viroid*, CVd: *Citrus viroid*



**Fig. 3** *In vitro* propagation of viroid-infected persimmon and treatments of thermotherapy, cold therapy and chemotherapy. A: *In vitro* culture, B: 2 weeks treated group shoot tip culture, C: 4 weeks treated group shoot tip culture, D: 8 weeks treated group shoot tip culture, E: Subculture of treated persimmon

바이로이드에 대해 모두 감염되어 있었다(Fig. 2). CVd 및 PVd가 감염된 기내배양 감을 이용하여 무병화 효율 실험을 수행하였다(Fig. 3). 감 무병화 묘목을 생산하기 위해서 열처리 및 한냉처리 그리고 항바이러스제 처리를 하는 단독 처리군과 열처리와 항바이러스제 동시 처리군 및 한냉처리와 항바이러스제 처리를 동시에 한 복합 처리군으로 나누어 각각의 무병화 효율을 조사하였다. 각각의 처리에 따른 감의 생존율은 열처리의 경우 2주 처리군에서 9개체 중 9개체 모두 생존하였지만 4주 및 8주에서는 생존율이 78%와 44%로 점차 낮아졌다. 한냉처리의 경우 2주와 4주의 경우 100%의 생존율을 보였으나 8주 처리군에서는 생존율이 33%로 급격히 저하됨을 알 수 있었다. 항바이러스제(ribavirin)의 경우는 감 생존율에 큰 영향을 보여주지 않아 각 처리별 생존율에 있어서는 항바이러스제 처리가 가장 좋은 것으로 판단되었다. 복합처리의 경우 단독처리보다 처리 기간이 증가함에 따라 생존율이 감소하는 현상이 뚜렷하였으며 40 ppm의 항바이러스제와 복합처리 군의 경우는 4주에서도 44%와 33%의 낮은 생존율을 보였고, 특히 8주차의 경우는 33% 이하의 낮은 생존율을 확인할 수 있었다.

바이로이드 제거 효율에 있어서는 단독 처리군의 경우 한냉 4주차의 결과가 생존율에 있어서 100% 결과를 나타냈고 바이로이드 제거 효율도 67%로 가장 높은 무병화 효율을 보여 주었다(Table 3). 열처리의 경우 71%의 무병화 효율을 확인하였으나 생존율이 낮아 확보한 무병화 개체수는 한냉처리에 비해 적었다. Paduch-Cichal과 Kryczynski (1987)는 국화의 potato spindle tuber viroid가 저온처리에 의해 효과적으로 제거됨을 보고하였으며, 본 결과에서도 바이로이드 제거 효율에 있어서는 열처리 군에 비해 한냉 처리가 무병화 효율이 높음을 알 수 있었다. 복합 처리군의 경우, 열처리와 항바이러스제 40 ppm 농도로 8주간 처리한 군과 한냉처리와 항바이러스제를 40 ppm 농도

로 8주간 처리한 군에서 100%의 바이로이드 제거 효율을 보여 주었으나 생존율이 11%와 33%로 매우 낮았고, 결론적으로 확보된 무병 개체 수가 적었다. 열처리와 항바이러스제를 20 ppm 농도로 4주간 처리한 군에서도 71%의 무병화 효율을 보였으나 최종적인 6개체의 무병묘가 획득된 처리는 한냉처리와 항바이러스제를 40 ppm 농도로 2주간 처리한 군이었다(Table 3). El-Dougdoug et al. (2010)은 단독처리에 의한 방법 이외에도 한냉처리와 항바이러스제 복합 처리에 의해 효과적인 무병화 방법을 보고하였다. *Hop stunt viroid*를 제거하기 위해 단독 처리의 경우 항바이러스제 처리가 가장 효과적임을 확인하였으며 복합처리의 경우는 한냉처리와 항바이러스제 처리를 같이 하였을 경우 생존률이 높아지고 무병화 효율 또한 높아짐을 보고하였다. 본 결과에서는 단독처리의 경우 한냉처리가 가장 좋은 효과를 보여주었지만 복합처리의 경우 위 논문과 유사한 결과를 도출하였다. 결론적으로 한냉 처리만으로는 약 4주간 처리한 군에서 67%의 항바이러스 제거 효율을 보여 주었으나 한냉 처리에 항바이러스제를 복합 처리한 군의 경우 시간을 단축시켜 2주간의 처리만으로도 효과적으로 바이로이드를 제거할 수 있을 것으로 판단할 수 있었다.

적 요

바이로이드에 감염된 과수의 생산성 하락으로 인한 농업인의 소득이 점점 감소하고 있는 실정이다. 감에 감염이 가능한 바이로이드는 PVd(*Persimmon viroid*)와 CVd(*Citrus viroid*) 등이 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 전라남도 감 재배 농가에서의 감 바이로이드 감염 현황을 확인하였고 열처리, 한냉처리, 항바이러스

**Table 3** The percentage of survival rate and viroid inactivation efficiency upon thermotherapy, cold-therapy and chemotherapy

Group	Shoot survival rate <sup>a</sup>			Viroid inactivation efficiency <sup>b</sup>		
	2 weeks	4 weeks	8 weeks	2 weeks	4 weeks	8 weeks
37°C	100% (9/9)	78% (7/9)	44% (4/9)	44% (4/9)	71% (5/7)	50% (2/4)
4°C	100% (9/9)	100% (9/9)	33% (3/9)	33% (3/9)	67% (6/9)	67% (2/3)
Ribavirin	20 ppm	100% (9/9)	100% (9/9)	33% (3/9)	33% (3/9)	33% (3/9)
	40 ppm	100% (9/9)	100% (9/9)	89% (8/9)	44% (4/9)	55% (5/9)
37°C + Ribavirin	20 ppm	89% (8/9)	78% (7/9)	33% (3/9)	38% (3/8)	71% (5/7)
	40 ppm	89% (8/9)	44% (4/9)	11% (1/9)	63% (5/8)	25% (1/4)
4°C + Ribavirin	20 ppm	89% (8/9)	100% (9/9)	33% (3/9)	38% (3/8)	44% (4/9)
	40 ppm	100% (9/9)	33% (3/9)	33% (3/9)	67% (6/9)	67% (2/3)

Virus infection was evaluated by RT-PCR.

<sup>a</sup>The number in parentheses refers to numbers of survival plant /numbers of total plants

<sup>b</sup>The number in parentheses refers to numbers of viroid free plant /numbers of survival plants



제 처리를 통해 무병화 효율성을 알아보았다. 전라남도 나주, 영암, 담양, 순천, 구례의 20농가에서 감 부유 품종 198개체를 샘플링하였다. RT-PCR 실험을 통해 감 바이로이드의 감염률을 확인해 본 결과 CVd 41%, PVd 34% 로 확인되었으며 이미 알려진 수준에 비해 높게 감염되어 있음을 알 수 있었다. 무병화 효율 실험은 PVd와 CVd가 감염된 감을 이용하였으며 처리 방법에 따라 열처리(38°C), 한냉처리(4°C), 항바이러스제(Ribavirin) 단독 처리 그룹과 열처리와 항바이러스제를 동시에 처리한 그룹 및 한냉처리 및 항바이러스제를 동시에 처리한 그룹으로 나누었으며 처리 시간에 따라 2주와 4주로 나누어 각각의 바이로이드 제거 효율을 확인하였다. 한냉 처리한 그룹의 경우 생존율이 100%에 무병화 효율 또한 67%의 높은 제거 효율을 확인할 수 있었고, 한냉 처리와 항바이러스제를 2주간 복합처리한 군에서도 67%의 높은 효율을 확인하였다. 결론적으로 한냉 처리가 가장 높은 무병화율을 보여 주었으며 본 연구결과를 통해 감 무병화 연구에 좋은 자료가 될 것으로 판단된다.

## 사 사

본 연구는 2015년 농촌진흥청 국립원예특작과학원의 기관 고유사업(과제번호: PJ010228052015)의 지원에 의해 수행되었음.

## Reference

- Campbell AI (1962) Apple virus inactivation by heat therapy and tip propagation. *Nature* 195 : 520
- El-DougDoug KA, Osman M, Abdelkader HS, Dawoud RA (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, 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, 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
- Ito T, Suzuki K, Nakano M (2013) Genetic characterization of novel putative rhabdovirus and dsRNA virus from Japanese persimmon. *J. Gene. Virol.* 94 : 1917-1921
- Kim DH, Kim HR, Heo S, Kim SH, Kim MA, Shin IS, Kim JH, Cho KH, Hwang JH (2010) Occurrence of *Apple scar skin viroid* and relative quantity analysis using Real-time RT-PCR. *Res. Plant Dis.* 16 : 247-253
- Kim DH, Shim HK, Kwon HM, Hyun JW, Kim KS, Lee JK, Lee SC (2005) Production of virus-free stocks from citrus plant by the shoot-tip grafting and heat treatment. *Korean J. Plant Biotech.* 32 : 45-50
- Lee G, Kim JS, Kim HR, Shin IL, Cho KH, Kim SH, Shin J, Kim DH (2013) Production system of virus-free apple plants using heat treatment and shoot tip culture. *Res. Plant Dis.* 19 : 288-293
- Morton JF (1987) Fruit of warm climates. Julia Frances Nakaune R and Nakano M (2008) Identification of a new Apscaviroid from Japanese persimmon. *Arch. Virol.* 153 : 969-972
- Paduch-Cichal E and Kryczynski S (1987) A low temperature therapy and meristem-tip culture for eliminating four viroids from infected pPlants. *J. Phytopathol.* 118 : 341-346
- Papstein F, Sedlak J, Polak J, Svobodova L, Hassan M, Bryxiova M (2008) Results of in vitro thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell. Tiss. Org.* 94 : 347-352
- Savitri WD, Park KI, Jeon SM, Chung MY, Han JS, Kim CK (2013) Elimination of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) from meristem tip culture combined with prolonged cold treatment. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 54 : 177-182