

# 열처리와 생장점 배양 및 항바이러스제 처리에 의한 포도 GLRaV-3의 무독화 효과

김현란\*, 정재동<sup>1</sup>, 박진우<sup>2</sup>, 최용문, 임명순  
원에연구소, <sup>1</sup>경북대학교, <sup>2</sup>농업과학기술원

## Effects of Thermotherapy and Shoot Apical Meristem Culture, Antiviral Compounds for GLRaV-3 Elimination in Grapevines

Hyun-Ran Kim\*, Jae-Dong Chung<sup>1</sup>, Jin-Woo Park<sup>2</sup>, Yong-Mun Choi, Myoung-Soon Yiem

National Horticultural Research Institute, Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-440, Korea

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

<sup>2</sup>Plant Pathology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

**ABSTRACT** Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) is one of the most severe pathogens for viral diseases found in Korea. This study was conducted to establish the virus-free stock production system for the virus disease control. The effects of thermotherapy, meristem culture and chemotherapy to eliminate the GLRaV-3 in grapevines were tested. Thermotherapy at  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  for 6~8 weeks combined with 0.5~1.0 mm size of meristem culture method was the most effective for virus elimination. Thermotherapy alone was not effective. In chemotherapy, DHT and Amantadine (20, 40 mg/L) treatment in medium was more effective than Ribavirin to eliminate the GLRaV-3 in grapevine. However, Ribavirin spraying to potted plant was not available for virus elimination. Therefore, virus-free stock production system using thermotherapy combined with shoot apical meristem culture was the most effective in grapevine.

**Key words:** Chemotherapy, ELISA, grapevine virus, RT-PCR, virus-free

### 서 론

식물체가 바이러스에 일단 감염되면 직접적인 치료방법이 없기 때문에 영양번식 작물에 있어서 바이러스병의 가장 효과적인 대책은 건전한 무독종묘를 이용하는 것이다. 바이러스 무독주 생산을 위해서 생장점 배양법이 최초로 이용되어 Morel과 Martin (1952)에 의해 다알리아 모자이크바이러스에 감염된 다알리아의 정단분열조직을 인공배지에서 무균적으로 배양함으로써 건전한 무독주를 최초로 획득하였다. 포도에서도 바이러스 무독개체를 얻기 위한 배양배지와 재분화 등 생장점 배양 기술에 관해서 많은 연구들이 보고되어 있으며

(Altmayer 1989; Barba et al. 1989; Barlass et al. 1987; Stellmach 1980; Wang and Hu 1980), 바이로이드 (viroid) 무독 개체 획득을 위해서도 생장점 배양기술이 이용되고 있다 (Burrows and Ashton 1993; Duran-Vila et al. 1988). 바이러스 제거를 위해 효과적으로 이용되는 열처리법은 식물조직에 감염된 바이러스가 정상보다 높은 온도에서 기주식물에서 바이러스 복제를 적게 하거나 식물체가 고사하지 않는 온도 범위 내에서 바이러스가 부분적으로 활성억제가 되거나 또는 완전히 불활성화된다는 원리이다 (Baker 1962). 하지만  $40^\circ\text{C}$ 의 고온 열처리에 의해 억제되었던 기주 식물체 단백질 합성에 관련된 효소의 활성이  $25^\circ\text{C}$ 로 온도가 변화된 후에 다시 활성이 회복되기 때문에 열처리법만 단독으로 이용하는 경우에 감염된 바이러스를 불활성화시킬 수 없는 경우가 많으므로 생장

\*Corresponding author Tel 031-290-6221 Fax 031-295-9548

E-mail kimhr0@rda.go.kr

접배양과 함께 병행하는 수단으로 활용하고 있다. 열처리하는 모체에서 배양재료를 절취하기 전이나 배양 중에 고온처리를 하는 데 열처리 기간이 절취하는 배양조직의 크기 및 무독화 효율에 큰 영향을 미치게 되므로 처리 후 비교적 큰 조직을 떼내어 배양함으로써 생존율이나 바이러스 무독주로 육성되는 비율을 높이고 있다 (Bhojwani and Rajdam 1996; Boxus et al. 1977; Wang and Hu 1980). 항바이러스제 등 화학약품을 처리하는 화학요법도 바이러스 무독주 생산시에 이용되고 있다. Ribavirin (1-β-D-Ribofulanosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide, virazole), DHT (2,4-Dioxohexahydro-1,3,5-triazine) 등을 이용한 바이러스 제거효과 (Blom-Barnh oom and Aartrijk 1985; Borissenko et al. 1985; Deogratias et al. 1989)들이 많이 보고되어 있다. 이러한 화학약품들은 이병식물체에 분무살포 처리하거나 기내 생육중인 식물체의 인공배지에 혼합 처리함으로써 과수작물의 여러 바이러스들을 성공적으로 제거하고 있다 (Hansen and Lane 1985). 이러한 화학약품에 의한 식물 바이러스 제거에 관한 생화학적 원리는 명확히 밝혀져 있지 않지만 최근 Ribavirin과 DHT가 RNA polymerase의 합성을 저해하고 외피단백질의 합성을 방해함으로써 *Potato virus X*의 복제를 억제하였다는 보고가 있다 (Lerch 1977; Klein and Livingston 1982). 이러한 항바이러스제들이 바이러스 방제를 위해 포장 조건에서는 실용적으로 이용되지 않고 있지만 조직배양에서는 바이러스 제거를 위해 배양배지내에 처리함으로써 효과적으로 이용되고 있다. 본 연구에서는 우리나라의 포도과원에 가장 많이 감염되어 있는 포도잎말림바이러스에 대한 무독주를 생산하고자 성장점배양 및 열처리요법 또는 화학요법 등을 이용하여 바이러스 제거에 미치는 효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 열처리요법

ELISA에 의해 GLRaV-3 감염이 확인된 이병주로부터 삼수를 채취하여 눈 2~3개를 포함시켜 약 15 cm 길이로 삼목하였다. 발근된 삼목묘를 포트에 이식하여 활착시키고 발아 후 약 5 cm 정도 신장하였을 때 습도가 60±5%이고 12시간 일장으로 조절된 growth chamber에서 37±2°C 온도조건으로 열처리하였다. 2, 4, 6, 8, 10주간 열처리한 각 처리구별로 3주씩을 처리 완료 직후부터 15일 간격으로 4회에 걸쳐 약 2 cm의 신초를 채취하여 바이러스 존재 유무를 효소결합면역항체법 (ELISA)으로 확인하였다.

### 열처리와 성장점 배양 병용

GLRaV-3에 감염된 포트묘와 이병신초를 채취하여 절간배

양한 기내 이병묘를 각각 열처리에 공시하였다. 열처리는 포트묘, 기내묘 모두 2~10주까지 실시하였고 2주 간격으로 신초 신장량을 조사하였으며, 열처리 후 각 처리별로 0.5~1.0 mm 크기의 성장점을 채취하여 배양하였다. 초대배양용 배지로는 1/2MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + kinetin 0.5 mg/L + adenine 4.0 mg/L, sucrose 3%, agar 0.7%, pH 5.8로 조정된 배지를 사용하였다. 성장점을 5개월 정도 배양하여 분화된 개체를 일부 선발하여 추출용 완충액을 1:8 (w/v) 농도로 첨가하여 즙액을 추출한 후 ELISA법으로 바이러스를 검정하였다.

### 화학요법

Ribavirin, DHT, Amantadine 등 3종의 항바이러스제를 첨가한 배양배지에서 GLRaV-3 이병주를 배양하여 바이러스 무독화 효과를 검정하는 방법과 이병 포트묘에 항바이러스제를 엽면살포하는 방법을 이용하여 처리효과를 검정하였다. 먼저 배지내 항바이러스제 처리에 의한 효과검정은 ELISA 법으로 GLRaV-3 감염이 확인된 거봉 품종의 나무를 본 시험에 공시하였다. 공시된 거봉품종의 신초를 채취하여 약 2 cm 길이로 조제한 후 1% sodium hypochlorite 용액에 15분 침지하여 살균한 후 정아 및 액아를 포함한 절간을 약 5 mm 길이로 잘라 항바이러스제가 첨가한 배지에 배양하였다. MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L, sucrose 3%, agar 0.7%, pH 5.8인 기본 배지에 Ribavirin (바이라미드), DHT, Amantadine (Adamantanamine) 등 3종의 항바이러스제를 각각 20, 40, 80 mg/L 농도로 조제한 다음 여과멸균하여 배지에 첨가하였다. 그리고 바이러스 이병묘를 처리당 10개체씩 30일, 60일, 90일 동안 배양한 후 ELISA법으로 진단하여 그 효과를 검정하였다. 항바이러스제 엽면살포처리에 의한 효과검정은 바이러스 이병주에서 삼수를 채취, 삼목하여 포트묘를 육성한 다음 발아 후 6주경부터 Ribavirin을 엽면살포 처리하였다. 처리는 100, 500, 1,000 mg/L 농도로 1주일 간격으로 2개월간 8회 처리하였다. 이들에 대한 효과 검정은 2, 5, 8회 처리완료 직후 신초를 기내배양한 다음 처리종료 1개월 후에 처리전의 신초를 배양한 대조구와 비교해서 동시에 ELISA검정으로 처리효과를 검토하였다. 무독주로 선발된 개체는 GLRaV-3 진단 프라이머를 이용하여 RT-PCR 진단하여 최종 확인하였다.

### 바이러스 진단

스위스 BIORBEA사로부터 IgG와 alkaline phosphatase가 결합된 conjugated-IgG를 구입하여 효소결합면역항체법 (ELISA)에 사용하였으며 검정할 시료는 Tris-HCl 완충액을 10배량 (w/v) 첨가하고 막자사발로 마쇄하여 즙액을 추출하였다. GLRaV-3 IgG를 coating buffer (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaN<sub>3</sub>, pH9.6)에 1,000배 농도 (1 μL/1 mL)로 희석하고 IgG 200 μL

씩을 microplate의 well에 넣어 30°C에서 4시간 동안 incubation하였다. PBS-T (phosphate buffered saline, 0.5% Tween-20)세척용액으로 well을 3회 이상 세척한 후 추출즙액을 well에 200 µL씩 넣고 4°C에서 overnight시켰다. PBS-T용액으로 well을 깨끗이 세척한 후 conjugate buffer (2% polyvinyl-pyrrolidone, 0.05% Tween-20, 0.2% bovine serum albumin)에 1,000배 농도로 희석한 conjugate IgG를 200 µL씩 넣어 30°C에서 5시간 동안 incubation 한 다음 PBS-T용액으로 세척한 후 substrate buffer (Diethanolamine, NaN<sub>3</sub>)에 pNPP (p-nitrophenyl-phosphate)를 1 mg/mL로 넣어 암상태에서 완전히 녹인 용액을 well당 200 µL씩 분주하고 암상태에서 30분~1시간 incubation하고 ELISA reader (Molecular device Co.)로 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. RT-PCR 진단을 위하여 기내 식물체로부터 Qiagen RNeasy Plant mini kit를 사용하여 RNA를 추출하였으며, Genbank (NCBI)를 검색하여 기 보고되어 있는 GLRaV-3의 염기서열을 기준으로 외피단백질유전자 부위를 증폭할 수 있도록 각각 25개의 염기로 primer를 작성하였다. 5 µL의 template RNA를 0.5 mL tube에 넣고 33 pmole 농도의 upstream primer (P1, 5'GCGG ATCCAT GGC AT TTGAAGTAA3'), downstream primer (P2, 5'CTACTT CTT TT GCAATAGTTGGAAG3')를 각각 1 µL씩 넣은 RT-PCR mix를 tube에 첨가한 다음 Promega사의 Access RT-PCR system kit를 사용하여 RT-PCR하였으며 BIOMETRA사의 UNO II 모델을 사용하여 먼저 48°C에서 45분간 역전사 반응을 시킨 다음 94°C에서 2분간 predenature 후 40 cycle로 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 68°C에서 2분간 elongation시키고 68°C에서 7분간 최종 반응시킨 후 4°C에서 보존하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel과 0.5 X TAE buffer (40 mM Tris acetate, 2 mM EDTA)를 사용하여 100 V에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator에서 밴드를 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

GLRaV-3에 감염된 포도 거봉품종의 꺾꽂이를 육성하여 37 ±2°C의 정온으로 열처리한 결과, 열처리 초기에는 신초가

1cm이상 급신장하다가 시간이 경과할수록 그 신장폭이 적어지고 생육이 불량해지며 신초가 고사하는 등 열처리에 의한 스트레스 증상을 나타내었다. 또한 바이러스 무독화율을 조사하기 위해 바이러스를 검정한 결과, 처리종료 15일 후에는 모든 처리구에서 바이러스가 제거되지 않아 단독 열처리법만으로는 바이러스 무독개체 획득이 어려운 것으로 조사되었다 (Table 1). 하지만 열처리법과 생장점 배양법을 같이 병행한 방법에서는 8~10주 열처리 후 생장점 배양한 경우 100% 무독개체를 얻을 수 있었다 (Figure 1). 선발된 무독개체를 RT-PCR에 의해 정밀 진단한 결과 대조구의 감염주에서 약 942 bp크기의 GLRaV-3 외피단백질유전자 크기의 특이 밴드가 검출된 데 반하여 선발개체에서는 밴드가 관찰되지 않았다 (Figure 2).

Wang과 Hu (1980)도 열처리법 단독처리에 의한 바이러스 무독화는 22~30% 정도 (Quak 1977)인 반면에 경정배양에 의한 무독화율은 약 80.4%로 열처리법보다 높은 무독화율을 나타내었고 열처리법과 경정배양법을 병용한 경우에 96%의 무독묘를 얻을 것으로 보고하고 있어 본 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 포도에서도 GLRaV와 GFLV 등 여러 종의 바이러스들을 제거하기 위해 열처리와 생장점 배양 기술을 병

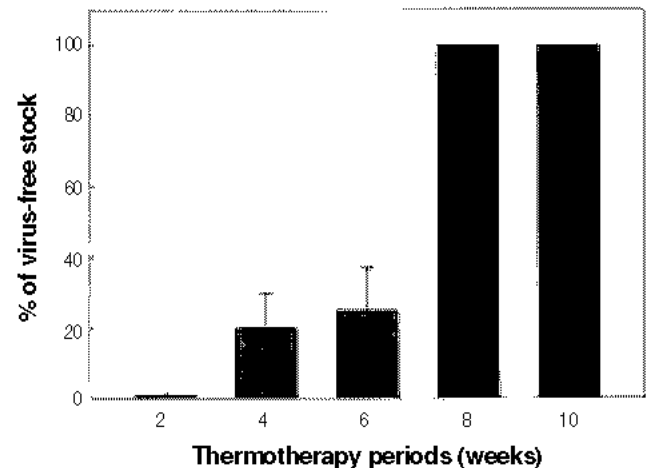


Figure 1. Virus-free stock production rate in the culture of shoot tips of GLRaV-3 infected grapevine at different thermotherapy periods at 37°C.

Table 1. Effects of thermotherapy on elimination of GLRaV-3.

Heat treatment (weeks)	Shoot growth (cm) <sup>2</sup>	No. of ELISA positive samples / tested samples (%)			
		0 <sup>y</sup>	15	30	45
2	1.36	15/15 (100)	15/15 (100)	15/15 (100)	15/15 (100)
4	1.35	15/15 (100)	15/15 (100)	15/15 (100)	15/15 (100)
6	0.90	13/15 (86.7)	15/15 (100)	15/15 (100)	15/15 (100)
8	0.30	13/15 (86.7)	15/15 (100)	15/15 (100)	15/15 (100)
10	0.18	12/15 (80.0)	15/15 (100)	15/15 (100)	15/15 (100)

<sup>2</sup> Means of 3 vines.

<sup>y</sup> Days after heat treatment

행한 방법이 많이 사용되어 왔으며 (Gifford and Hewitt 1961; Bass and Legin 1984; Savino et al. 1990; Staudt and Kassemeyer 1994), GLRaV-3과 같은 *Closterovirus*의 경우 *Nepovirus*에 비해 바이러스 제거가 다소 어렵다고 하였다 (Savino et al. 1990). 기내 배양묘를 열처리한 경우에 GLRaV-1, GLRaV-3 모두 6~8주 처리에서 60~80%의 무독개체를 얻을 수 있어 큰 포트묘를 열처리하는 것에 비해 다소 무독화 효과는 떨어졌지만 실험규모를 축소할 수 있으며 간편하게 무독묘를 생산할 수 있다는 점에서 이용 효율성이 높을 것으로 생각된다 (Figure 3). Barlass와 Skene (1978)이 35°C에서 90일간 기내 배양묘의 열처리를 통해 바이러스 무독묘를 획득한 보고에서와 같이 본 시험에서도 6~8주간의 처리에서 60~80%의 높은 무독묘 획득율을 얻을 수 있어 무독묘 생산 시 기내배양묘를 이용하는 경우 적은 면적에서 대량으로 열처리가 가능하고 노력도 줄일 수 있으므로 효과적일 것으로

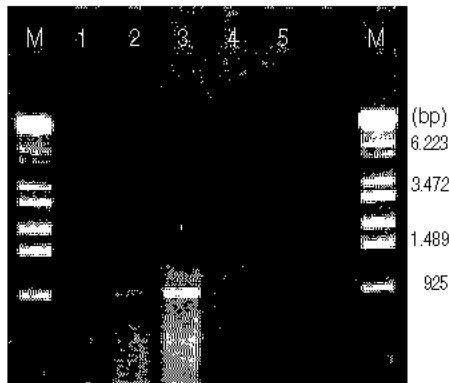


Figure 2. Agarose gel electrophoretic analysis of RT-PCR products from GLRaV-3 free selected plantlets. M: Size marker( $\lambda$ DNA/Sty I), Lane 2, 3: virus-infected, Lane 1, 4, 5: virus-free plantlet.

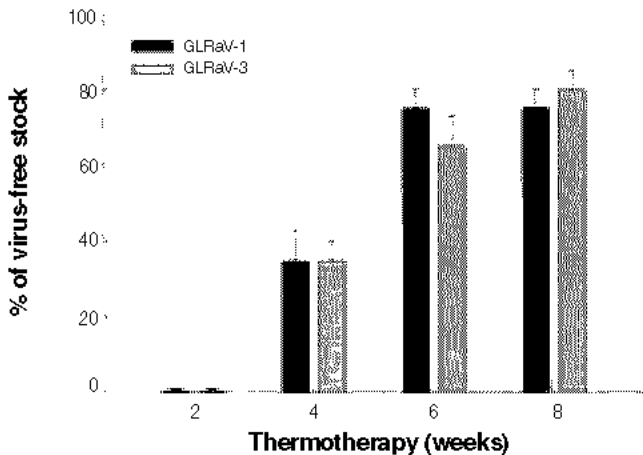


Figure 3. Virus-free stock production rate in the culture of shoot tips of GLRaV-3 infected in vitro grapevine plantlet at different thermotherapy periods at 37°C.

생각되었다. 화학요법으로 배양배지에 Ribavirin 등 3종의 항바이러스제를 처리한 결과 모두 처리전의 바이러스 농도에 비해 처리 30일 후부터 GLRaV-3 제거가 확인되었고, 특히 Amantadine의 경우 30일간 처리한 경우에도 현저하게 바이러스 제거효과가 인정되었다 (Figure 4). 하지만 DHT와 Amantadine의 80 mg/L의 고농도 처리는 기내묘의 생육을 다소 억제시키는 것으로 나타나 (Table 2), 생육에 미치는 영향을 최소화하고 바이러스를 제거시킬 수 있도록 20~40 mg/L 농도의 항바이러스제를 일정기간 이상 배지내에 첨가 처리함으로써 바이러스 무독화율을 높이는데 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 생각한다. Hansen 등 (1985)은 사과 생장점 부분 조직을 저농도의 Ribavirin을 첨가한 배지에 배양하여 *Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV)*를 제거하였으며, Stevenson과 Monette (1983)는 Ribavirin의 기내 처리에 의해 포도 leafroll 병징의 발현이 지연되었음을 보고하고 있어 항바이러스제의 배지내 첨가시 바이러스 억제효과를 뒷받침해 주고 있다. Ribavirin을 이병 포트묘에 엽면살포 처리한 경우에는 처리하기 전 점정조직에서의 바이러스 농도가 매우 낮고 불균일하였으며 처리 후에도 바이러스 농도가 불균일하게 나타나 처리효과를 판단할 수 없었다 (Table 3). Ribavirin 엽면살포시 수체내의 바이러스를 완전히 제거할 수는 없으므로 바이러스 무독화를 위한 다른 방법이 같이 병행되어야 하며 처리와 점정이 반복되어야 하는 등 실용화되기에는 많은 문제점을 가지고 있다. 따라서 바이러스 무독화를 위한 항바이러스제의 엽면 살포 처리의 실용화를 위해서는 지속적인 보완연구와 함께 항바이러스제의 작용기작 연구가 수행되어야 할 것으로 생각한다.

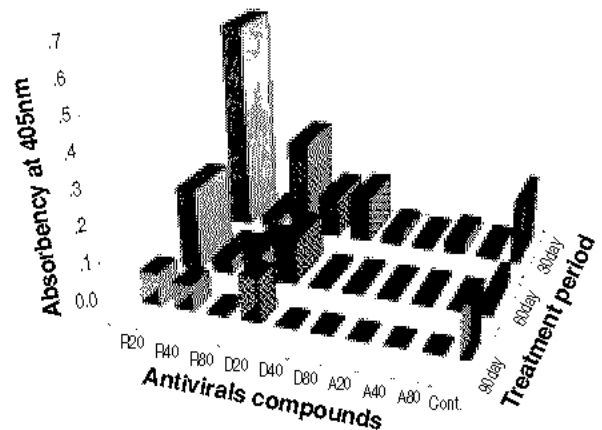


Figure 4. Chemotherapy effects on elimination of GLRaV-3 in plantlets cultured on antiviral compounds added medium. R20~R80: Ribavirin 20, 40, 80 mg/L, D20~D80: DHT 20, 40, 80 mg/L, A2~A80: Amantadine 20, 40, 80 mg/L.

**Table 2.** Effects of antiviral compounds on regeneration and subsequent growth of plantlet when cultured *in vitro*.

Antiviral compounds	Concentrations (mg/L)	Fresh weight (mg)	No. of shoots	Phytotoxicity (%)
Ribavirin	20	611.0 a <sup>z</sup>	5.1 a	0
	40	298.5 ab	3.1 ab	0
	80	170.0 b	3.3 ab	0
DHT	20	191.0 b	2.9 ab	0
	40	109.5 b	2.9 ab	0
	80	70.5 b	1.8 b	0
Amantadine	20	139.5 b	3.1 ab	0
	40	94.5 b	3.1 ab	0
	80	101.0 b	2.9 ab	0
Infected control	-	47.5 b	2.0 b	-

<sup>z</sup> Analyzed by Duncan's multiple range test**Table 3.** GLRaV-3 elimination rate when sprayed different concentrations of Ribavirin on the potted grapevine.

Concentrations (mg/L)	ELISA results (Absorbency of 405nm)			
	before treatment	2 times	5 times	8 times
100	0.084	0.285	0.379	0.001
500	0.041	0.025	0.030	0.017
1,000	0.022	-	0.189	0.050
Infected control	0.121	0.052	0.059	0.045

Note; Ribavirin was sprayed, every 1 week.

## 적 요

우리나라의 포도 재배과원에 가장 많이 감염되어 있는 GLRaV-3에 대한 무독묘를 생산하고자 생장점 배양 및 열처리요법 또는 화학요법 등을 이용하여 바이러스 제거에 미치는 효과를 검토한 결과 열처리 후 생장점 배양하는 방법이 무독묘 생산효율이 가장 높았다. 열처리요법 단독 처리에서는 처리종료 15일 후 바이러스 진단결과 모든 처리구에서 바이러스가 제거되지 않았으며, 8~10주 동안 열처리한 후 생장점 배양한 경우에는 100% 무독개체를 획득할 수 있었다. 화학약품을 배양배지내 첨가하는 화학요법 처리구에서는 Ribavirin에 비해 20, 40 mg/L 농도의 Amantadine, DHT가 바이러스 제거에 효과적이었으며 80 mg/L의 농도는 다소 식물체의 생육에 저해작용을 하는 것으로 판단되었다.

## 인용문헌

- Altmayer B (1989) Elimination of different nepoviruses and grapevine leafroll by *in vitro* apical culture of grapevine. ICVG 155-158
- Baker R (1962) Chemotherapy of planting material. *Phytopathology* 52: 1244-1255
- Barba M, Cupidi A, Faggiolo F (1989) *In vitro* culture of grapevine infected by Closterovirus Type III. *J Phytopathology* 126: 225-230
- Barlass M, Skene KGM (1978) *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis* 17: 335-340
- Barlass M, Skene KGM, Woodham RC, Krake LR (1982) Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. *Ann Appl Biol* 101: 291-295
- Bass P, Legin R (1984) Chemotherapy and *in vitro* multiplication of grapevine apex its use for the elimination of virus disease and for the estimation damages. *Progr Agric Vitic* 101: 270-274
- Bhojwani SS, Rajdam MK (1996) *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Revised Edition, Elsevier, Amsterdam, pp 767
- Blom-Bamhoom GJ, Aartrijk J (1985) The regeneration of plants free of LSV and TBV from infected *Lilium* bulb-scale explants in the presence of virazole. *Acta Horticulturae* 164: 163-168
- Borissenko S, Schuster G, Schmygla W (1985) Obtaining a high percentage of explants with negative serological reactions against viruses by combining potato meristem culture with antiphytoviral chemotherapy. *Phytopathol Z* 114: 185-188
- Boxus P, Quoirin M, Laine JM (1977) Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In: J. Reinert, Bajaj YPS (eds), *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Springer-Verlag, Berlin pp 130-143
- Burrows G, Ashton K (1993) Meristem tip culture of grapevines for virus and viroid elimination. *Aust. Grape-grower Winemaker Nov* pp 60-62
- Deogratias JM, Dosba F, Lutz A (1989) Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic ringspot virus, and apple chlorotic leaf spot virus in sweet cherries by a combination of chemotherapy,

- thermotherapy and *in vitro* culture. *Can J Plant Pathology* 11: 337-342
- Duran-Vila N, Juarez J, Arregui JM (1988) Production of viroid-free grapevines by shoot tip culture. *Am J Enol Vitic* 39: 217-220
- Gifford EM, Hewitt WB (1961) The use of heat therapy and *in vitro* shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from grapevine. *Am J Enol Viticult* 12: 129-130
- Hansen AJ, Lane WD (1985) Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by Ribavirin. *Plant Disease* 69: 134-135
- Klein RE, Livingston CH (1982) Eradication of potato virus X from potato by Ribavirin treatment of cultured potato shoot tips. *Am Potato J* 59: 359-365
- Lerch B (1977) Inhibition of the biosynthesis of potato virus X by Ribavirin. *Phytopath Z* 89: 44-49
- Morel G, Martin C (1952) Guérison des dahlias atteints d'une maladie à virus. *CR Acad Sci Paris* 235: 1324-1325
- Quak F (1977) Meristem culture and virus-free plants. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds), *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Springer-Verlag, Berlin, pp 598-615
- Savino V, Boscia D, D'Onghia AM, Martelli GP (1990) Effect of heat therapy and meristem tip culture on the elimination of grapevine leafroll associated closterovirus type III. *Proc 10th Meeting ICVG*, Volos, Greece, pp 433-436
- Staudt G, Kassemeyer HH (1994) Elimination of grapevine leafroll associated virus type I in *Vitis vinifera* cv. Lemberger. *Vitis* 33: 179-180
- Stellmach G (1980) Propagation of healthy plants from green tips produced on vines infected with NEPO-viruses. *Z Pflanzenkrankh Pflanzensch* 87: 92-96
- Stevenson JH, Monette PL (1983) Delay of onset of leafroll symptom expression in *Vitis vinifera* Lemberger from Ribavirin-treated *in vitro* cultures. *Can J Plant Sci* 63: 557-560
- Wang PJ, Hu NY (1980) Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. In: Fiechter A (ed), *Advances in Biochemical Engineering: Plant Cell Culture*. II, Springer-Verlag, Berlin. pp 61-99

(접수일자 2003년 2월 11일, 수리일자 2003년 4월 11일)