

항바이러스제 처리와 경정배양에 의한 배(*Pyrus pyrifolia* L.) ‘만수’의 *Apple stem grooving virus* 무병화

조강희 · 신주희 · 김대현 · 박서준 · 김세희 · 천재안 · 김미영 · 한점화 · 이한찬

Elimination of *Apple stem grooving virus* from ‘Mansoo’ pear (*Pyrus pyrifolia* L.) by an antiviral agent combined with shoot tip culture

Kang Hee Cho · Juhee Shin · Dae-Hyun Kim · Seo Jun Park · Se Hee Kim · Jae An Chun · Mi Young Kim · Jeom Hwa Han · Han Chan Lee

Received: 2 May 2016 / Revised: 7 June 2016 / Accepted: 7 June 2016

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In this study, *in vitro*-cultured ‘Mansoo’ pear (*Pyrus pyrifolia* L.) plants infected with *Apple stem grooving virus* (ASGV) were used for testing the efficiency of the virus elimination methods. The shoot tips cut from infected plants were treated by thermotherapy (37°C), cold therapy (4°C), chemotherapy with ribavirin, and combination of these methods. Treatment periods were 2, 4, and 8 weeks, and concentrations of ribavirin were 20 and 40 mg·L⁻¹. The efficiency of ASGV elimination was evaluated by reverse transcription polymerase chain reaction. The shoot survival rate was the highest at 100% after cold therapy, chemotherapy, and combination of two methods, while the rate was the lowest at 33.3% after thermotherapy for 2 weeks. The shoot survival rate after chemotherapy decreased gradually as the treatment period was prolonged. The ASGV elimination rate was the highest at 100% after ribavirin treatment at a concentration of 40 mg·L⁻¹ and combination of ribavirin treatment and thermotherapy for 2 weeks, whereas the ASGV elimination rate after cold therapy was the lowest at 16.7%. However, the efficiency of ASGV elimination was enhanced up to 43.3% by the combination of cold therapy and ribavirin treatment. The efficiency of ASGV elimination for all treatments was increased as the treatment period was

prolonged. Based on these results, we suggest that ribavirin treatment at a concentration of 20 mg·L⁻¹ for 4 weeks or at a concentration of 40 mg·L⁻¹ for 2 weeks combined with shoot tip culture was efficient for the elimination of ASGV from pear.

Keywords Shoot tip, Thermotherapy, Cold therapy, Chemotherapy, Elimination

서 언

배(*Pyrus pyrifolia* L.)는 우리나라의 신선 농산물 수출 2위 작목으로 농업생산에서 중요한 원예작물로 알려져 있다(MAFRA 2015). 배에서 주로 발생하는 대표적인 바이러스는 *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV)가 있다(Cho *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010). 이 중 국내 배 재배단지에서는 ASGV의 발생률이 가장 높으며 ASPV는 2010년에 국내에서 처음 발생이 보고되었다(Cho *et al.* 2010). 이러한 바이러스에 감염된 배나무는 생장과 과실 품질이 저하되고 생산량이 감소된다(Desvignes and Boye 1989). 특히 ASPV와 ACLSV가 감염된 식물체와 달리 ASGV가 감염된 ‘신고’의 잎에서는 부정형의 검은점 증상이 나타나 피해가 큰 것으로 관찰되었다(Cho *et al.* 2010). 바이러스는 주로 접목에 의해 전염이 되며 감염된 식물체는 소각 외에는 다른 방제 대책이 없기 때문에 무병묘 생산 시스템의 개발이 중요하다(Lee *et al.* 2013). 따라서 과수에서 바이러스를 제거하기 위한 무병화 연구는 다양한 방법으로 수행되었다.

K. H. Cho (✉) · J. H. Shin · D.-H. Kim · S. J. Park · S. H. Kim · J. A. Chun · M. Y. Kim · J. H. Han · H. C. Lee
농촌진흥청 국립원예특작과학원 과수과
(Fruit Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea)
e-mail: khc7027@Korea.kr

바이러스를 무병화하는 방법은 37°C로 일정기간 처리하는 열처리 요법(thermotherapy), 4°C로 일정기간 처리하는 한냉 요법(cold therapy), ribavirin과 같은 항바이러스제를 처리하는 화학적 요법(chemotherapy) 등이 있다(EI-DougDoug *et al.* 2010; Paprstein *et al.* 2008; Wang *et al.* 2006). 경정배양과 열처리는 사과(Lee *et al.* 2013; Paprstein *et al.* 2008), 배(Tan *et al.* 2010; Zilka *et al.* 2002), 복숭아(Gella and Errea 1998), 포도(Maliogka *et al.* 2009) 등의 바이러스를 제거하는데 효과적으로 사용되어 왔다. Tan *et al.* (2010)은 ACLSV, ASGV, ASPV가 감염된 배 ‘Fengshui’의 식물체를 주간 42°C, 야간 34°C에서 55일 이상의 열처리와 경정배양을 통해 바이러스가 제거되는 것을 확인하였다. 열처리에 의해 경정조직에서 바이러스가 제거되는 기작은 고온에서 바이러스의 복제 또는 이동이 저해되고 식물체의 성장속도가 빨라 그 결과 생장점 부위로부터 바이러스가 제거되는 것으로 알려져 있다(Cooper and Walkey 1978). 또한 고온처리에 의해 RNA의 silencing이 증가되고 경정조직에서 바이러스 RNA가 분해되는 것이 확인되었다(Chellappan *et al.* 2005; Wang *et al.* 2008). EI-DougDoug *et al.* (2010)은 *Hop stunt viroid* (HSVd)에 감염된 복숭아 ‘Florida prince’와 배 ‘Balady’를 이용하여 한냉처리와 항바이러스제 처리를 통해 40%의 무병화 개체를 획득하였다. 이러한 바이러스 제거 효율은 바이러스와 기주 식물체의 종류와 복합 감염된 바이러스의 조합에 따라 달라진다고 보고되었다(Knapp *et al.* 1995).

본 연구에서는 ASGV 감염이 확인된 배 기내 식물체를 이용하여 열처리, 한냉처리 및 항바이러스제 단독 및 복합처리를 통하여 효율적인 ASGV 무병화 방법을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료

배 바이러스 무병화 효율 실험을 위하여 국립원예특작과학원에 보존 중인 배 ‘만수’의 기내 배양묘 신초 부위의 잎을

채취하여 실험에 이용하였다.

RNA 추출 및 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용한 바이러스 진단

바이러스를 진단하기 위하여 배 ‘만수’의 신초를 이용하여 Cetyl trimethyl ammonium bromide 방법을 통해 total RNA를 추출하였다(Gambino *et al.* 2008). 확보된 total RNA는 M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 random hexamer 프라이머를 이용하여 cDNA를 합성하였으며, 바이러스 특이 프라이머(Table 1)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 진단 바이러스와 바이로이드 종류는 ACLSV, ASGV, *Apple scar skin viroid* (ASSVd)의 3종이었다. PCR 조건은 총 20 µL의 반응액에 cDNA 50 ng, 1×PCR buffer, 250 µM dNTPs, 1.5 units *Ex Taq* DNA polymerase (TaKaRa, Tokyo, Japan)를 혼합하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 초기 변성시키고, 94°C에서 40초, 60°C에서 40초, 72°C에서 40초씩 35회 반복하였다. 마지막으로 5분간 처리 후 반응을 종료하였다. 또한 18S ribosomal RNA를 함께 증폭시켜 RT-PCR 반응이 제대로 이루어졌는지 확인하기 위한 대조구로 이용하였다.

바이러스 감염 식물체의 기내 증식

바이러스 감염이 확인된 배 기내 식물체를 증식하기 위하여 증식배지에 치상하였다. 사용한 증식배지의 조성은 Murashige & Skoog (MS) 배지 4.4 g·L⁻¹, 6-benzylaminopurin 1.0 mg·L⁻¹, 3-indole-butyric acid 0.1 mg·L⁻¹, sucrose 30 g·L⁻¹, plant agar 8 g·L⁻¹였으며 pH 5.8로 조정하였다. 증식배지에 치상한 식물체는 3주마다 계대배양을 실시하여 실험재료를 확보하였다.

무병화 처리

RT-PCR을 통해 바이러스 감염이 확인된 배 ‘만수’의 기내 식물체를 이용하여 열처리, 한냉처리 및 항바이러스제 처

Table 1 RT-PCR primer pairs used for the detection of pear-infecting viruses and viroid infected pear plants

Target	Primer sequence (5' → 3')	PCR product size (bp)	Original accession No.
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	F: TTCATGGAAAGACAGGGGCAA R: AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA	677	KC935956
<i>Apple stem grooving virus</i>	F: ATGAGTTTGGGAAGACGTGCTTCAA R: CTAACCCTCCAGTTCCAAGTTACT	699	JX885581
<i>Apple scar skin viroid</i>	F: CCCGGTAAACACCGTGCGGT R: ACCGCGAAACACCTATTGTG	331	JX860405
18S ribosomal RNA	F: CGCATCATTCAAATTTCTGC R: TTCAGCCTTGCACCATACT	843	DQ341382

리를 통하여 무병화 효율 실험을 수행하였다. 각 처리별 30개의 배양된 배 신초를 확보하였고 약 5 mm 크기로 잘라 실험에 이용하였다. 열처리와 한냉처리는 각각 37°C와 4°C가 유지되는 항온 항습 장치에서 처리하였으며 항바이러스제 처리 그룹은 ribavirin (1-B-D-ribofuransyl-1,2,4-triazole caboxamide, Virazole)을 배지에 20 mg·L⁻¹과 40 mg·L⁻¹의 농도로 첨가하여 25°C에서 처리하였다. 또한 열처리와 항바이러스제를 복합적으로 처리한 그룹과 한냉처리와 항바이러스제를 복합 처리한 그룹으로 나누어 처리하였다. 처리기간은 2주, 4주 및 8주였으며 처리 후 경정배양을 통해 자란 식물체는 RT-PCR를 이용하여 무병화 여부를 확인하였다. 통계처리는 SAS 프로그램(SAS 9.2, SAS Institute Inc., NC, USA)을 이용하였으며 Duncan의 다중검정($p < 0.05$)으로 평균치간의 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

배 ‘만수’의 기내 식물체를 이용하여 RT-PCR로 ACLSV, ASGV, ASSVd를 진단한 결과 ASGV의 감염이 확인된 식물체를 확보할 수 있었다(Fig. 1A). 무병화 효율 실험을 위한 재료를 확보하기 위하여 ASGV가 감염된 기내 식물체를 증식하였고(Fig. 1B), 증식된 식물체의 ASGV를 진단하여 감염

여부를 재확인하였다(Fig. 1C). 증식된 식물체를 이용하여 열처리, 한냉처리, 항바이러스제를 단독 또는 복합처리하여 신초 생존율과 바이러스 제거율을 조사하였다(Fig. 2).

처리에 따른 신초 생존율은 37°C 열처리의 경우 2주간 처리 그룹에서 33.3%였고, 4주 및 8주간 처리 그룹에서는 3.3%와 0%으로 낮아졌다(Table 2). 이와 같이 열처리에 의한 바이러스 제거 방법의 가장 큰 문제는 본 실험에서 같이 식물체의 낮은 생존율이다(Hu *et al.* 2012; Lee *et al.* 2013). 고온이거나 처리기간이 길어지면 바이러스의 불활성화율은 높아지지만 식물체가 분화되는 비율은 현저하게 저하된다. Lee *et al.* (2013)은 사과 ‘썸머드림’ 등 4품종의 바이러스 무병묘를 생산하기 위해 열처리와 경정배양을 통한 기내도입 과정 중 신초 생존율은 25.0~41.7%로 낮았음을 보고하였다. 따라서 신초 생존율을 높이기 위해 비교적 낮은 온도인 35°C에서 열처리하는 방법도 보고되었다(Hu *et al.* 2012). 경정배양을 하기 전에 낮은 온도에서 처리하는 것은 바이러스를 제거하는 방법 중의 하나로 알려져 있다(Paduch-Cichal and Kryczyński 1987). 4°C에서 2개월 처리한 HSVd에 감염된 배의 신초 생존율이 31.0%였다는 El-DougDoug *et al.* (2010)의 연구결과와 달리 본 실험의 한냉처리에서는 2~8주의 처리기간 모두 100%의 높은 생존율을 나타내었다. 항바이러스제인 ribavirin을 20 mg·L⁻¹ 농도로 2주 및 4주간 처리한 그룹에서는 100%의 생존율을 보였지만 8주간 처리한 그룹에서

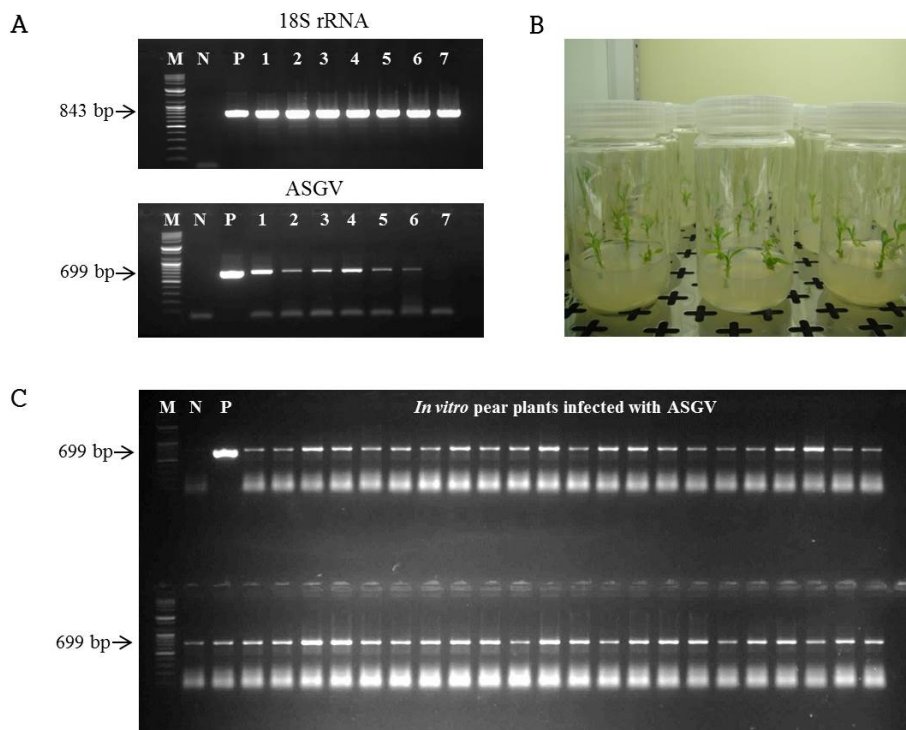


Fig. 1 Preparation of plant materials for the elimination test of *Apple stem grooving virus* (ASGV). (A) RT-PCR products amplified from *in vitro* ‘Mansoo’ pear plants using 18S ribosomal RNA and ASGV specific primers. M, 100 bp DNA plus ladder; N, negative control; P, positive control; 1-7, *In vitro* ‘Mansoo’ pear plants. (B) *In vitro* propagation of ‘Mansoo’ pear infected with ASGV. (C) Results for the detection of ASGV in *in vitro* propagated plants by RT-PCR

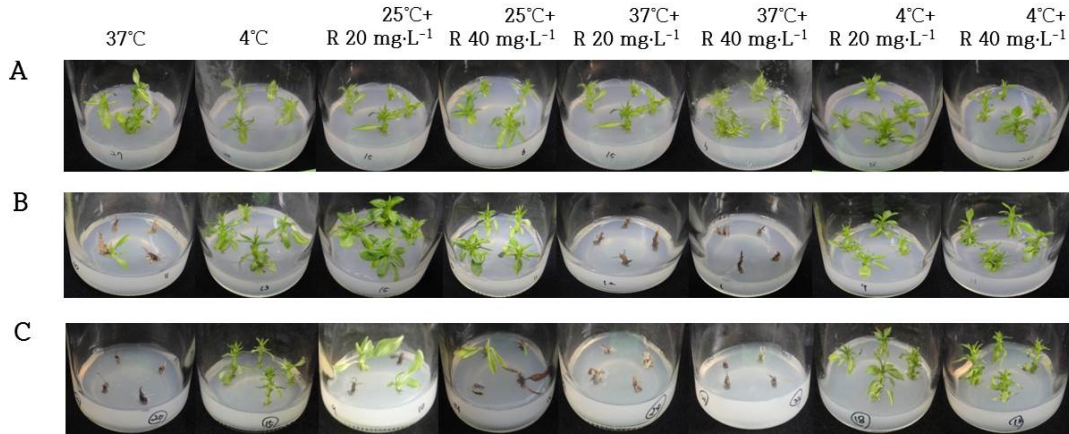


Fig. 2 Comparison of *in vitro* pear plants treated by thermotherapy, cold therapy, and chemotherapy. A, Two week treated *in vitro* plants; B, Four week treated *in vitro* plants; C, Eight week treated *in vitro* plants

Table 2 Shoot survival rate in pear shoots after being subjected to *in vitro* thermotherapy, cold therapy, and chemotherapy

Treatment		Shoot survival rate (%)		
		Treatment period_2 weeks	Treatment period_4 weeks	Treatment period_8 weeks
37°C		33.3 (10/30) ^a c ^b	3.3 (1/30) c	0.0 (0/30) d
4°C		100.0 (30/30) a	100.0 (30/30) a	100.0 (30/30) a
Ribavirin	20 mg·L ⁻¹	100.0 (30/30) a	100.0 (30/30) a	30.0 (9/30) b
	40 mg·L ⁻¹	100.0 (30/30) a	96.7 (29/30) b	20.0 (6/30) c
37°C + Ribavirin	20 mg·L ⁻¹	46.7 (14/30) b	0.0 (0/30) d	0.0 (0/30) d
	40 mg·L ⁻¹	36.7 (11/30) c	0.0 (0/30) d	0.0 (0/30) d
4°C + Ribavirin	20 mg·L ⁻¹	100.0 (30/30) a	100.0 (30/30) a	100.0 (30/30) a
	40 mg·L ⁻¹	100.0 (30/30) a	100.0 (30/30) a	100.0 (30/30) a

^aThe number in parentheses refers to the number of surviving shoots/the number of treated shoots

^bDifferent letters within each column indicate significant differences based on Duncan's multiple range test at $p < 0.05$

는 30.0%로 급격히 낮아졌다. 또한 ribavirin을 40 mg·L⁻¹ 농도로 처리한 그룹에서는 신초 생존율이 처리기간에 따라 100%, 96.7% 및 20.0%로 점차 낮아져 항바이러스제 처리 기간은 4주까지가 적당한 것으로 판단되었다. 이는 Kim *et al.* (2015)의 결과와도 유사하여 *Persimmon viroid*와 *Citrus viroid*가 감염된 감을 이용한 무병화 효율 연구에서 항바이러스제 처리가 신초 생존율이 가장 높은 것으로 보고하였다. 열처리와 항바이러스제의 복합 처리인 경우 ribavirin을 20 mg·L⁻¹ 농도로 2주간 처리한 그룹에서는 46.7%, 40 mg·L⁻¹ 농도로 처리한 그룹에서는 36.7%의 낮은 생존율을 나타냈고, 4주 및 8주간 처리한 그룹에서는 생존한 개체가 없었다. 이와 달리 한냉처리와 항바이러스제 복합처리에서는 처리기간에 상관없이 모두 100%의 생존율을 나타내었다.

ASGV 제거 효율에 있어서는 단독처리인 경우 열처리의 바이러스 제거율은 2주 및 4주간 처리한 그룹에서는 80.0%와 100%였지만 생존율이 매우 낮아 4주간 열처리를 통하여 확보된 무병화 개체 수는 1개체로 다른 처리에 비해 가장 적

었다. 열처리에 의한 바이러스 제거 효율은 감염된 식물체의 바이러스 농도와도 관련이 있으며 바이러스 제거가 어려운 품종도 있고, 단독 감염보다 여러 종류의 바이러스가 복합 감염된 경우에 바이러스 제거가 더 어려운 것으로 알려져 있다(Knapp *et al.* 1995; Papstein *et al.* 2008). 한냉처리를 2주간 처리한 그룹에서는 16.7%, 4주 및 8주간 처리한 그룹에서는 66.7%의 ASGV 제거율을 나타내었다(Table 3). 경정배양 전의 한냉처리는 고온에 저항성 바이로이드인 *Chrysanthemum stunt viroid*, *Hop latent viroid* 등을 제거하는 효과적인 방법으로 보고되었다(El-DougDoug *et al.* 2010). Ribavirin을 20 mg·L⁻¹와 40 mg·L⁻¹으로 2주간 처리하였을 때 바이러스 제거율은 각각 80%와 100%였고 4주 및 8주간 처리 그룹에서는 모두 100%의 바이러스 제거율을 나타내었다. 식물에 있어서 열처리와 달리 항바이러스제 처리를 이용한 바이러스 제거 기간은 명확히 알려져 있지 않지만 핵산과 RNA polymerase의 합성을 저해하여 바이러스 복제를 억제하는 것으로 보고되었다(Hansen 1989; Verma *et al.* 2005). 복합처리의 경우

Table 3 Effect of *in vitro* treatments on inactivation of *Apple stem grooving virus* in pear

Treatment	<i>Apple stem grooving virus</i> inactivation efficiency (%)		
	Treatment period_2 weeks	Treatment period_4 weeks	Treatment period_8 weeks
37°C	80.0 (8/10) ^a b ^b	100.0 (1/1) a	NT ^c
4°C	16.7 (5/30) d	66.7 (20/30) c	66.7 (20/30) b
Ribavirin	20 mg·L ⁻¹	80.0 (24/30) b	100.0 (30/30) a
	40 mg·L ⁻¹	100.0 (30/30) a	100.0 (29/29) a
37°C + Ribavirin	20 mg·L ⁻¹	92.9 (13/14) a	NT
	40 mg·L ⁻¹	100.0 (11/11) a	NT
4°C + Ribavirin	20 mg·L ⁻¹	43.3 (13/30) c	93.3 (28/30) b
	40 mg·L ⁻¹	83.3 (25/30) b	100.0 (30/30) a

^aThe number in parentheses refers to the number of virus free shoots/number of surviving shoots

^bDifferent letters within each column indicate significant differences based on Duncan’s multiple range test at *p* < 0.05

^cNT: Not tested

열처리와 ribavirin 2주간 처리에서는 ribavirin을 20 mg·L⁻¹ 농도로 처리한 그룹에서는 92.9%, 40 mg·L⁻¹에서는 100%의 바이러스 제거율을 나타내었다. 한냉처리와 ribavirin 복합처리에서는 ribavirin 농도를 20 mg·L⁻¹하여 2주간 처리한 그룹에서는 바이러스 제거율이 43.3%, 4주 및 8주간 처리한 그룹에서는 93.3%와 100%로 처리기간이 길수록 바이러스 제거율이 높았고 40 mg·L⁻¹ 농도로 2주간 처리한 그룹에서의 바이러스 제거율은 83.3%였다. 이는 최종적으로 획득한 무병화 개체가 30개체 중 25개체로 ribavirin 단독처리에 비해 바이러스 제거율이 낮았다. Cieślińska (2002)는 ACLSV가 감염된 배 ‘Pierre Corneille’ (*Pyrus communis* L.)의 기내 식물체를 이용하여 열처리(36°C)와 ribavirin 처리를 통하여 바이러스를 제거하고자 하였다. 항바이러스제 처리 효과는 ribavirin의 농도에 따라 달라지는데 100 mg·L⁻¹의 고농도에서는 77%의 신초가 식물독성을 나타내었고 고온과 함께 처리하면 대부분의 신초가 고사되었다. Ribavirin 25 mg·L⁻¹와 50 mg·L⁻¹의 농도로 처리된 신초는 enzyme-linked immunosorbent assay를 통해 각 신초의 78%와 88%에서 ACLSV가 검출되지 않은 것을 확인하였다. 또한 열처리와 항바이러스제 복합처리가 항바이러스제 단독처리보다 더 좋은 결과를 나타내지는 않았다고 보고하여 본 실험에서 얻은 결과와 유사하였다. 이와 달리 Hu *et al.* (2012)은 ACLSV와 ASGV가 감염된 배 ‘Jinshui’ (*Pyrus pyrifolia* L.)의 기내 식물체에 열처리와 항바이러스제를 복합처리하였을 때 단독처리보다 ACLSV와 ASGV의 제거 효율이 높았다. 특히 36°C에서 40일간 열처리와 25 mg·L⁻¹ 농도의 ribavirin 복합처리 후 성장점 배양을 통해 바이러스가 100% 제거되어 가장 높은 효율을 나타내었다. 또한 10-25 mg·L⁻¹ 농도의 ribavirin 처리는 유의하게 기내 배 식물체의 증식을 향상시켰다. 이와 같이 항바이러스제는 바이러스 제거에 효과적이지만 고농도에서는 식물체에 식물독성과 같은 약해를 줄 수 있다. 식물독성의 증상으로

는 식물체의 엽록소 분해, 선단 괴사 및 재생이 저해되는 것으로 알려져 있으나 배양 후 15일부터는 그 영향이 없어지는 것으로 보고되었다(El-DougDoug *et al.* 2010). 본 실험에서도 ribavirin 처리 배지에서는 시간이 지날수록 신초 엽이 연한 녹색을 띄었지만 증식배지에 옮겨주면 엽색이 진한 녹색으로 되는 것을 관찰할 수 있었다(자료 미제시). Knapp *et al.* (1995)은 immune tissue-printing 방법을 이용하여 ACLSV가 감염된 기내 사과 품종들의 ACLSV 분포를 살펴본데 ACLSV의 축적은 줄기 지저부분에서 가장 많고 신초 선단으로 갈수록 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 바이러스 감염 정도는 줄기 횡단면 내에서의 바이러스의 분포뿐만 아니라 성장점으로 바이러스가 확산되는 것에 영향을 주었고, 경미하게 바이러스에 감염된 신초의 성장점 조직에서는 바이러스가 전혀 관찰되지 않았다. 바이러스 무병화에는 열처리 등 다양한 기술이 이용되지만 단독처리로는 감염된 바이러스를 완전히 불활성화시킬 수 없는 것이 많기 때문에 정정배양과 함께 병행하고 있다.

결론적으로 본 실험에서는 정정배양과 더불어 항바이러스제인 ribavirin을 20 mg·L⁻¹ 농도로 4주간 처리하거나 40 mg·L⁻¹ 농도로 2주간 단독처리만으로도 효과적으로 배 ASGV를 제거할 수 있을 것으로 판단할 수 있었다. 그러나 실험 대상 바이러스가 ASGV 1종으로 제한적이어서 ACLSV, ASPV 등 다른 바이러스가 단독 또는 복합감염된 식물체를 이용하여 정밀한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각한다.

적 요

본 연구는 *Apple stem grooving virus* (ASGV)에 감염된 배 (*Pyrus pyrifolia* L.) ‘만수’의 기내배양 식물체를 이용하여 효과적

인 배 바이러스 무병화 기술을 알아보려고 수행하였다. 식물체의 경정조직을 잘라 열처리(37°C), 한냉처리(4°C), 항바이러스제인 ribavirin을 단독 또는 복합처리하였다. 처리기간은 2, 4, 8주였으며 ribavirin 농도는 20과 40 mg·L⁻¹이었다. 바이러스 제거율은 Reverse transcription polymerase chain reaction 분석으로 확인하였다. 신초 생존율은 2주간 한냉처리, 항바이러스제 단독처리와 한냉처리와 항바이러스제가 복합처리된 그룹에서 100%로 높았고 열처리에서 33.3%로 가장 낮았다. 단독으로 ribavirin을 처리한 그룹은 처리기간이 길수록 신초 생존율이 감소하는 경향이 있었다. ASGV 제거율은 2주간 ribavirin 40 mg·L⁻¹ 농도로 처리한 그룹과 열처리와 ribavirin을 복합처리한 그룹에서 100%로 높았다. 한냉처리한 그룹의 바이러스 제거율은 16.7%로 가장 낮았으나 한냉처리와 ribavirin을 복합처리한 그룹에서는 43.3%로 향상되었다. 모든 처리에서 처리기간이 길수록 바이러스 제거율은 증가하였다. 본 실험을 통해 배 ASGV 제거에는 경정배양과 더불어 항바이러스제인 ribavirin을 20 mg·L⁻¹ 농도로 4주간 처리하거나 40 mg·L⁻¹ 농도로 2주간 단독처리만으로도 효과적으로 무병화가 가능할 것으로 판단되었다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01022805)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Chellappan P, Vanitharani R, Ogbe F, Fauquet CM (2005) Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants. *Plant Physiol* 138:1828–1841
- Cho IS, Kim DH, Kim HR, Chung BN, Cho JD, Choi GS (2010) Occurrence of pome fruit viruses on pear trees (*Pyrus pyrifolia*) in Korea. *Res Plant Dis* 16:326–330
- Cieślńska M (2002) Elimination of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. *Acta Hort* 596:481–484
- Cooper VC, Walkey DGA (1978) Thermal inactivation of *Cherry leaf roll virus* in tissue cultures of *Nicotiana rustica* raised from seeds and meristem tips. *Ann Appl Biol* 88:273–278
- Desvignes JC, Boye R (1989) Different diseases caused by the *Chlorotic leaf spot virus* on the fruit trees. *Acta Hort* 235:31–38
- El-DougDoug KA, Osman ME, Abdelkader HS, Dawoud RA, Elbaz RM (2010) Elimination of *Hop stunt viroid* (HSVd) from infected peach and pear plants. *Aust J Basic Appl Sci* 4:54–60
- 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
- Gella R, Errea P (1998) Application of *in vitro* therapy for ilarvirus elimination in three *Prunus* species. *J Phytopathol* 146:445–449
- Hansen AJ (1989) Antiviral chemicals for plant disease control. *Crit Rev Plant Sci* 8:45–88
- Hu GJ, Hong N, Wang LP, Hu HJ, Wang GP (2012) Efficacy of virus elimination from *in vitro*-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. *Crop Prot* 37:20–25
- Kim DH, Kim IS, Lee G, Cho IS, Cho KH, Shin IS, Kim SH, Chun JA, Choi IM (2015) Current occurrence of *Persimmon viroid* and *Citrus viroid* in persimmon in JellaNam-do and testing for viroid inactivation methods. *J Plant Biotechnol* 42:43–48
- Knapp E, Hanzer V, Weiss H, da Câmara Machado A, Wang Q, Weiss B, Katinger H, Laimer da Câmara Machado M (1995) Distribution of *Apple chlorotic leaf spot virus* in apple shoots cultivated *in vitro*. *Acta Hort* 386:187–194
- Lee G, Kim JH, Kim HR, Shin IS, 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
- Maliogka VI, Skiada FG, Eleftheriou EP, Katis NI (2009) Elimination of a new ampelovirus (GLRaV-Pr) and *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars combining *in vitro* thermotherapy with shoot tip culture. *Sci Hort* 123:280–282
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (2015)
- Paduch-Cichal E, Kryczyński S (1987) A low temperature therapy and meristem-tip culture for eliminating four viroids from infected plants. *J Phytopathol* 118:341–346
- Paprstein F, Sedlak J, Polak J, Svobodova L, Hassan M, Bryxiova M (2008) Results of *in vitro* thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 94: 347–352
- Tan R, Wang L, Hong N, Wang G (2010) Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101:229–235
- Verma N, Ram R, Zaidi AA (2005) *In vitro* production of *Prunus necrotic ringspot virus*-free begonias through chemo- and thermotherapy. *Sci Hort* 103:239–247
- Wang L, Hong N, Wang GP, Xu WX, Michelutti R, Wang AM (2010) Distribution of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* in infected *in vitro* pear shoots. *Crop Prot* 29:1447–1451
- Wang L, Wang G, Hong N, Tang R, Deng X (2006) Effect of thermotherapy on elimination of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* for *in vitro*-cultured pear shoot tips. *HortScience* 41:729–732
- Wang QC, Cuellar WJ, Rajamäki ML, Hirata Y, Valkonen JPT (2008) Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Mol Plant Pathol* 9:237–250
- Zilka S, Faingersh E, Rotbaum A, Tam Y, Spiegel S, Malca N (2002) *In vitro* production of virus-free pear plants. *Acta Hort* 596:477–479