

# **Wirus chlorotycznej plamistości liści jabłoni (ACLSV) – polifagiczny patogen drzew owocowych**

*Mirosława Cieślińska, Maria Kamińska*

*Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa  
ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice*

**Słowa kluczowe:** ACLSV, rośliny żywicielskie, wykrywanie, zwalczanie

## **Wstęp**

Wirus chlorotycznej plamistości liści jabłoni (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), zaliczany do rodzaju *Trichovirus* [39], występuje prawie na całym świecie; w krajach Azji Wschodniej, Europy, Ameryki Północnej, w Chinach, Australii i Nowej Zelandii [43]. Zakres roślin żywicielskich ACLSV obejmuje ponad 70 gatunków należących do 14 rodzin botanicznych. Naturalnymi gospodarzami wirusa są gatunki roślin sadowniczych: *Malus* spp., *Pyrus* spp. [12], *Prunus* spp., *Persica* spp., *Armeniaca* spp. [14, 51] oraz wiele gatunków należących do rodzin *Amaranthaceae*, *Apo-cynaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Graminae*, *Legumi-nosae*, *Portulacaceae*, *Rosaceae*, *Solanaceae*, *Tetragoniaceae*, *Umbeliferae*, *Valeria-naceae*, *Vitidaceae*.

Szczepy ACLSV różnią się między sobą właściwościami biologicznymi, fizycznymi, biochemicznymi oraz serologicznymi. Różnice te mogą wpływać na rodzaj i intensywność objawów chorobowych wywoływanych przez szczepy wirusa na roślinach żywicielskich.

Celem pracy było zebranie aktualnych danych dotyczących szkodliwości wirusa, jego właściwości, zróżnicowania objawów chorobowych wywoływanych przez szczepy wirusa na różnych gatunkach drzew owocowych oraz przedstawienie metod wykrywania i sposobów zwalczania ACLSV.

## Szkodliwość ACLSV

ACLSV szczególnie powszechnie występuje w sadach jabłoniowych, powodując zazwyczaj infekcję utajoną (latentną) drzew szlachetnych odmian. Z badań Deogratias i in. [10] wynika, że we Francji wirusem tym porażonych było około 30% drzew jabłoni [10], w USA zaś – 60% [53]. W Polsce obecność ACLSV w sadach wykrywano już w latach sześćdziesiątych. Stwierdzono wówczas, że wirus najczęściej poraża jabłonie. Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że ACLSV nadal powszechnie występuje w sadach towarowych oraz w matecznikach podkładek wegetatywnych i sadach zraźnikowych jabłoni [35]. Chociaż szkody spowodowane porażeniem sadów jabłoniowych przez wirusa nie są duże, jednakże biorąc pod uwagę powszechne występowanie ACLSV w Polsce, globalne straty mogą być znaczne. W niektórych krajach wirus ten poraża również w dużym stopniu drzewa pestkowe. Di Terlizzi i in. [14] stwierdzili jego obecność w 33% śliw, 53% moreli i 49% brzoskwiń uprawianych na południu Włoch.

ACLSV wywołuje różnorodne objawy chorobowe, których rodzaj i intensywność zależą od gatunku i odmiany rośliny gospodarza, izolatu wirusa oraz warunków otoczenia. Wprawdzie porażenie większości odmian jabłoni przebiega bezobjawowo, ACLSV wpływa niekorzystnie na wzrost i plonowanie drzew [40]. Szkodliwość wirusa zwiększa się, gdy drzewo porażone jest równocześnie przez inne wirusy. Jabłonie porażone ACLSV i wirusem jamkowatości pnia jabłoni (*Apple stem pitting virus*, ASPV) mogą wykazywać plamistość pierścieniową owoców oraz nekrozy na liściach i pniu wrażliwych odmian, czego następstwem bywa zamieranie drzew [11]. Wykazano, że jabłonie szczepione na podkładce *Malus prunifolia* BORKH. var. *ringo* 'Asami' (Maruba kaido) porażonej ACLSV, na skutek uszkodzenia tkanek przewodzących pnia podkładki objawiających się jamkowatością drewna i nekrozą kory, często zamierają po 1–3 latach od posadzenia [50]. Inne badania dowiodły, że jabłonie szczepione na chorej podkładce Maruba kaido rosły słabiej, miały bardziej spłaszczone pnie i drobniejsze owoce [34].

Porażone wirusem grusze wykazują objawy mozaiki pierścieniowej liści i owoców (pear ring pattern mosaic), zahamowanie wzrostu młodych drzew i łatwiej przemarzają [17, 43].

ACLSV powoduje uszkodzenie owoców śliwy podobne do wywołanych przez wirus ospowatości śliwy (*Plum pox virus*, PPV) [11], opadanie owoców [28], spękanie kory drzew, jamkowatość pnia podkładki oraz niezgodność zrazą z podkładką [12].

Na liściach brzoskwini porażonej ACLSV występują ciemnozielone, jakby zagłębione cętki i wzory liniowe, na owocach zaś – chlorotyczne pierścienie i wzory przypominające objawy porażenia PPV [11].

Na roślinach *Prunus serrulata* LINDL. 'Shirofugen', na których okulizowano brzoskwinię porażoną ACLSV, już po miesiącu obserwowano nekrozę w miejscu zrośnięcia komponentów [45] oraz zahamowanie wzrostu drzew [22]. Większość odmian

czereśni porażonych ACLSV nie wykazuje objawów chorobowych. Znane są jednak szczepy wirusa wywołujące nekrotyczne plamy na owocach oraz spękanie kory i zamieranie drzew [11].

Badania przeprowadzone we Francji wykazały, że morele porażone ACLSV tworzą rozety liści i wykazują niezgodność zraza z podkładką [11] oraz jamkowatość pnia podkładki występującą dopiero po kilkunastu latach od szczepienia [22]. Porażone drzewa słabiej plonują, a ich owoce są drobne, zdeformowane, o niejednorodnym zabarwieniu i gorzkim smaku. Chore drzewa niektórych odmian moreli mogą przedwcześnie zamierać [15]. ACLSV powoduje silne zahamowanie wzrostu pigwy, chlorotyczne pierścienie i wzory liniowe oraz deformacje liści [17].

## Właściwości ACLSV

---

Cząstki ACLSV są wydłużone, nitkowate, o symetrii helikalnej, z widocznym kanałem centralnym. Za pomocą technik mikroskopii elektronowej wykazano, że długość cząstek wirusa izolowanego z różnych gatunków drzew owocowych wynosiła od 620 do 825 nm, szerokość zaś 12 nm [36, 45, 49, 51]. Dokładne określenie długości cząsteczek ACLSV jest trudne, ponieważ podczas oczyszczania i przygotowania preparatu łamią się one i ulegają degradacji. W skład wirionów nie wchodzi lipidy i cukrowce.

Cząstka ACLSV składa się z kapsydu białka o masie ok. 19,7–25 kDa [8, 44, 45, 54]. Genom stanowi jednoniciowe (ss)RNA o masie  $2,5 \times 10^3$  kDa [36] poliadenylowane na końcu 3' w orientacji kodującej [54]. Na elektrofotogramie obserwowano pięć prążków dwuniciowego (ds)RNA wyizolowanego z komórek roślin porażonych ACLSV [54]. W latach dziewięćdziesiątych określono sekwencję nukleotydów genomu izolatów ze śliwy [23], z jabłoni [48] i czereśni [25] oraz wyizolowano dwuniciowe RNA (dsRNA) wirusa i przeprowadzono jego analizę [24].

Trwałość wirusa (LIV) w temperaturze 20°C, w soku in vitro systemicznie porażonych roślin *Chenopodium quinoa*, wynosiła jeden dzień, punkt inaktywacji termicznej (TIP) – 52–55°C, rozcieńczenie graniczne (DEP) –  $10^{-4}$  [45].

Właściwości biologiczne izolatów ACLSV określano na podstawie reakcji wybranych gatunków drzewiastych, z których najczęściej stosowano *Malus sylvestris* Mill. R 12740-7A, *Malus platycarpa* REHDER [46] oraz *Prunus persica* (L.) BATSCH. Spośród zielnych roślin różnicujących, w badaniach właściwości biologicznych ACLSV, najczęściej używano *Chenopodium quinoa* WILLD. i *C. amaranticolor* COSTE et REYN. [45, 46], choć ACLSV wywoływał również objawy chorobowe na innych gatunkach, m.in.: *Gomphrena globosa* L. [6, 52], *Beta vulgaris* L., *Amaranthus paniculatus* L., *Celosia argentea* L., *Tetragonia expansa* MURR. [6].

## Przenoszenie wirusa

---

W szkólkach i sadach ACLSV przenoszony jest wraz z porażonym materiałem rozmnożeniowym, tj. ze zrazami, oczkami i podkładkami rozmnażanymi wegetatywnie. Wirus ten nie przenosi się z nasionami i pyłkiem. Dosba i in. [15] zanotowali rozprzestrzenianie się wirusa z chorych moreli na drzewa zdrowe, lecz nie ustalili sposobu przenoszenia patogena. Brak jest danych wskazujących na istnienie naturalnych wektorów wirusa.

## Metody wykrywania ACLSV

---

Jeszcze w połowie lat siedemdziesiątych do wykrywania i identyfikacji ACLSV stosowano test biologiczny oparty na reakcji wskaźnikowych roślin wrażliwych na infekcję wirusem. Najczęściej do tego celu używano roślin *Malus sylvestris* R 12740-7A, *Malus platycarpa* [46] oraz *Prunus persica* 'Elberta' [51] i 'GF 305' [4, 13].

Od ponad 20 lat do badań nad wirusem stosuje się metodę ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) [1, 13, 16, 18]. Mimo zalet, jakimi są szybkość, czułość i specyficzność, metoda ta bywa zawodna z powodu zróżnicowania szczepów, nierównomiernego rozmieszczenia i niskiej koncentracji wirusa w tkankach roślin drzewiastych [1, 8, 13, 16, 38]. Dodatkowym problemem przy wykrywaniu ACLSV jest występowanie inhibitorów w naturalnie porażonych roślinach. Aby ograniczyć wpływ tych czynników stosowano różnego rodzaju modyfikacje testu ELISA. Jedną z nich polegała na jednoczesnej inkubacji ekstraktu roślinnego i koniugatu (tzw. cocktail ELISA) i zastosowaniu buforu ekstrakcyjnego z dodatkiem dwuetylodwutiokarbaminianu sodu (NaDIECA) [16]. Inne badania dowiodły, że dodatek nikotyny, jonów magnezowych i 3,3-dwuaminodwupropylaminy również poprawiały wykrywalność wirusa w moreli [13]. Zarówno wprowadzenie modyfikacji cocktailu ELISA, jak i dodatku nikotyny nie wpływały na poprawę skuteczności wykrywania ACLSV w brzoskwini [4]. Obok najczęściej stosowanego testu bezpośredniego DAS-ELISA, przy wykrywaniu ACLSV korzystano również z testu pośredniego F(ab')<sub>2</sub>-ELISA, który wykazywał nieco większą czułość oraz pozwalał na różnicowanie szczepów wirusa. Niektóre szczepy ACLSV ze śliwy słabiej reagowały w tym teście z surowicami przygotowanymi na izolaty z jabłoni, co oznacza, że w warunkach naturalnych występują co najmniej dwa serotypy ACLSV [1]. Zwiększenie czułości testu ELISA i ograniczenie występowania reakcji niespecyficznych osiągnięto również po zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych, które ponadto umożliwiały różnicowanie szczepów ACLSV [37, 47].

Rzadziej niż test ELISA, do wykrywania ACLSV stosowano różne techniki mikroskopii elektronowej. Kalashjan i Lipartia [30] wykazali, że bardziej czuła niż tech-

nika barwienia negatywowego była metoda immunoelektronomikroskopii (IEM), w której, do wychwytywania cząstek wirusa z soku *Chenopodium quinoa* i *Malus platycarpa*, stosowano specyficzne surowice. Do wykrywania wirusa w soku porażonych roślin oraz w celu określenia jego właściwości serologicznych stosowano metodę immunosorpcyjną mikroskopii elektronowej (ISEM), w której opłaszczano siatki mikroskopowe surowicą, a następnie po nałożeniu preparatu wirusa jego cząstki były dekorowane surowicą [51]. Stosując tę technikę zaobserwowano, że cząstki wirusa w soku *Prunus domestica* były dłuższe (825 nm) niż w oczyszczonym preparacie (795 nm). Czułość metody ISEM była porównywalna z czułością testu ELISA [31].

W ostatnich latach do diagnostyki ACLSV wprowadzono metody oparte na wykrywaniu i analizie kwasu nukleinowego patogena. Najpowszechniej stosowana jest amplifikacja kwasu nukleinowego wirusa za pomocą techniki opartej na łańcuchowej reakcji polimerazy (Polymerase Chain Reaction – PCR), którą poprzedza reakcja odwrotnej transkrypcji (Reverse Transcription – RT) [5, 8, 37, 44]. Identyfikację szczepów wirusa przeprowadzano metodą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP) uzyskanych po trawieniu enzymami produktu PCR [5, 8, 44]. Czułość tych technik jest bardzo wysoka, a ich przydatność duża, szczególnie latem, kiedy możliwości wykrywania wirusa testem ELISA są ograniczone. Przy użyciu techniki IC-RT-PCR, z wychwytywaniem cząstek wirusa przez specyficzne przeciwciała (immunocapture – IC), wykrywano ACLSV w oczyszczonym preparacie w koncentracji 10 fg ( $1 \text{ fg} = 10^{-12} \text{ g}$ ), co odpowiada ok. 100 cząstkom wirusa [5].

Poza techniką PCR, do identyfikacji izolatów ACLSV stosowano molekularną hybrydyzację cDNA (MH) metodą Southerna. Produkt PCR (cDNA) przenoszono elektroforetycznie na membranę, którą następnie hybrydyzowano z sondą (zsyntetyzowana sztucznie nić DNA z wbudowanym znacznikiem digoxygeniną) [42]. ACLSV wykrywano i identyfikowano również na podstawie wyników analizy dwuniciowego RNA wirusa [23].

## Wykrywalność ACLSV w drzewach owocowych

Z licznych badań wynika, że wykrywalność ACLSV w roślinach drzewiastych zależy nie tylko od zastosowanej metody diagnostycznej, ale także od gatunku drzewa, części rośliny i terminu pobierania próbek. ACLSV jest nierównomiernie rozmieszczony w drzewach owocowych – w sąsiedztwie pąków, w których wykrywano obecność wirusa, może występować tkanka wolna od patogena. Porównując skuteczność wykrywania ACLSV w liściach położonych w różnych częściach pędów jabłoni, wykazano, że największa koncentracja wirusa jest w pobliżu nasady pędu [1]. Nierównomierne rozmieszczenie ACLSV stwierdzono także w pędach jabłoni namnażanych in

vitro – koncentracja wirusa bliżej wierzchołka pędu była znacznie niższa niż u jego podstawy [33].

Analizując wyniki testu ELISA dotyczące wykrywania ACLSV w liściach i pąkach kwiatowych z pędów pędzonych w szklarni oraz w liściach naturalnie rozwiniętych w sadzie, Fuchs [19] stwierdził, że wykrywalność wirusa wzrastała od marca do maja-czerwca. Patogen był wykrywany także w mrożonych próbkach liści i płatków korony. Przydatność różnych organów jabłoni do wykrywania ACLSV w ciągu roku była zróżnicowana [18]. Dobrym źródłem wirusa w okresie styczeń–kwiecień były pędzone w szklarni pąki, w kwietniu – naturalnie rozwijające się pąki, w maju – płatki korony, zaś w okresie maj–czerwiec – liście. W łyku można było stwierdzić obecność ACLSV w okresie od maja do sierpnia, w korze – od stycznia do marca i, podobnie jak w owocach, od września do grudnia. Barba i Clark [1] wykrywali ACLSV w liściach jabłoni od czerwca do listopada. Wyniki wielu prac badawczych dowodzą, że płatki są najlepszym źródłem wirusa w jabłoniach [6, 8, 18, 19]. Flegg i Clark [16] stwierdzili, że w jabłoni łatwiej było wykryć ACLSV w płatkach korony niż w liściach, w których koncentracja wirusa spadała wraz z ich wiekiem. W korze jabłoni, bez względu na porę roku, nie można było wykazać obecności wirusa. Owoce mogły być przydatne do wykrywania ACLSV nawet po pewnym okresie przechowywania. Koncentracja wirusa w miąższu w pobliżu kielicha była wyższa niż w skórce owocu [6, 20].

Do wykrywania ACLSV testem ELISA w gruszach, Fuchs i in. [20] zalecali używanie kory młodych pędów w okresie od sierpnia do maja, owoców – od lipca do połowy października oraz łyka – w okresie czerwiec–lipiec. Barba i Clark [1] nie zdołali wykryć obecności ACLSV w drzewach porażonej gruszy niezależnie od terminu testowania, Cieślińska [6] zaś wykazała, że wczesną wiosną możliwe było wykrycie ACLSV w łyku pędzonych pędów, a w połowie maja – dodatkowo w płatkach korony i liściach drzew rozwijających się w sadzie. Latem najlepszym źródłem wirusa były owoce gruszy [6, 8, 20].

W czereśniach ACLSV można wykryć w pąkach śpiących lub w podpędzanych w szklarni pąkach, w płatkach korony – w czasie kwitnienia naturalnie rozwijających się drzew, w liściach – od końca kwietnia do września, w korze – przez cały rok, w owocach zaś – od czerwca do sierpnia [9, 20].

W śliwach Fuchs i in. [20] wykrywali ACLSV tylko w płatkach korony na przełomie kwietnia i maja. Badania Cieślińskiej i in. [8] wykazały, że dobrym źródłem wirusa jest łyko i dojrzałe owoce śliw, a wiosną i jesienią również liście [6].

Cambra i in. [4] wykrywali ACLSV w brzoskwiniach w ciągu całego roku, wykorzystując do testowania płatki korony, młode liście i pędy wiosną, liście – latem oraz pędy – jesienią i zimą. Cambra i in. [3] wykazali, że ACLSV jest nierównomiernie rozmieszczony w brzoskwiniach i morelach. Najlepszym źródłem wirusa w drzewach moreli były płatki korony i skórka owoców [46].

## Metody zwalczania ACLSV

Możliwości bezpośredniego zwalczania ACLSV w sadach są bardzo ograniczone z uwagi na brak środków chemicznych zwalczających wirusy. Najważniejszym sposobem zapobiegania chorobom wywoływanym przez patogena jest zakładanie sadów ze zdrowego materiału szkółkarskiego. Sady takie, posadzone z drzew o wysokim statusie zdrowotności, pozostaną wolne od ACLSV przez cały okres uprawy, gdyż wirus ten nie jest przenoszony przez owady czy pyłek kwiatów. Konieczne jest prowadzenie lustracji pod kątem obecności objawów wywoływanych przez ACLSV w sadach gruszkowych i pestkowych, zwłaszcza wtedy, gdy drzewa pochodziły ze szkółki niekwalifikowanej. Lustrację należy przeprowadzać bardzo dokładnie, gdyż wirus często jest nierównomiernie rozmieszczony w drzewach i objawy chorobowe w początkowym okresie mogą występować tylko na pojedynczych gałęziach.

Chociaż praktycznie nie można uwolnić chorych drzew w sadzie od wirusa, ACLSV może być stosunkowo łatwo wyeliminowany z roślin po poddaniu ich działaniu temperatur w zakresie 36–38°C przez kilka tygodni [27, 32]. W badaniach, mających na celu uwolnienie podkładek jabłoni od wirusa, z powodzeniem stosowano termoterapię, a następnie z nowo wyrosłych pędów pobierano merystemy wierzchołkowe i namnażano je w kulturach *in vitro*. Za pomocą testów serologicznych wykazano, że wiele uzyskanych w ten sposób pędów było wolnych od ACLSV [21]. Termoterapii można poddawać również pędy porażonych roślin namnażane w warunkach *in vitro*. Metoda ta pozwoliła na uwolnienie ACLSV z 59% traktowanych pędów śliw i 71% pędów brzoskwiń [2].

Inną metodą uwalniania roślin od ACLSV jest mikroszczepienie *in vitro*. W metodzie tej merystem pobrany z pędu chorej rośliny nakładany jest na zdrową zdekapitowaną siewkę spełniającą rolę podkładki. „Zraz” wyrosły na podkładce w większości wypadków jest wolny od wirusa. Metoda ta okazała się bardzo skuteczna w uwalnianiu pędów śliwy i brzoskwini od ACLSV [2, 29, 41].

Kolejną techniką pozwalającą na eliminację wirusów jest chemoterapia. W metodzie tej szczególnie duże zastosowanie znalazła ribawiryna (1-B-D ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide, nazwa handlowa Virazol). Virazol w dawkach 20–80 ppm · l<sup>-1</sup>, dodany do pożywki w kulturach *in vitro*, hamował namnażanie ACLSV w wielu traktowanych pędach [26].

Znacznie skuteczniejsze może być łączenie wymienionych metod uwalniania od wirusa. Dzięki zastosowaniu termoterapii i chemoterapii w kulturach *in vitro* oraz mikroszczepienia *in vitro* i *in vivo* został wyeliminowany z czereśni kompleks wirusów ACLSV, karłowatości śliwy (*Prune dwarf virus*, PDV) i nekrotycznej plamistości pieńścieniowej drzew pestkowych (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) [10]. Połączenie termoterapii i chemoterapii z zastosowaniem 25 mg · dm<sup>-3</sup> Virazolu pozwoliło na uwolnienie od ACLSV 82% pędów jabłoni i 78% pędów gruszy. Po dodaniu do pożywki 50 mg · dm<sup>-3</sup> Virazolu uzyskano odpowiednio: 100% i 88% pędów wolnych od wirusa. Równocześnie stwierdzono, że Virazol w dawkach 50–100 mg · l<sup>-1</sup> działał fitotoksycznie na pędy mnożone w kulturach *in vitro* [7, 9].

## Podsumowanie

Wirus chlorotycznej plamistości liści jabłoni (ACLSV) jest patogenem powszechnie występującym w uprawie roślin sadowniczych na całym świecie. ACLSV poraża jabłonie, grusze, śliwy, czereśnie, morele, brzoskwinie. Jabłonie na ogół nie wykazują objawów chorobowych, u pozostałych gatunków zaś wirus wywołuje różnorodne symptomy. Do wykrywania ACLSV stosowane są testy biologiczne, serologiczne (ELISA, IEM, ISEM) oraz testy oparte na wykrywaniu kwasów nukleinowych wirusa (RT-PCR, MH). Ze względu na zróżnicowanie szczepów wirusa, niską koncentrację cząstek patogena oraz ich nierównomierne rozmieszczenie w tkankach porażonych roślin, powszechnie stosowany do wykrywania wirusów test ELISA bywa zawodny, szczególnie jeśli jest wykonywany w okresie lata. Dla różnych gatunków drzew owocowych zostały określone terminy prowadzenia testów oraz części roślin, które powinny być pobierane do wykrywania wirusa. ACLSV jest termolabilny i łatwo ulega inaktywacji w temperaturze 37°C utrzymywanej przez kilka tygodni. Właściwość ta jest wykorzystywana w celu uwalniania porażonych roślin od wirusa metodą termoterapii. Ponadto do eliminacji ACLSV stosowana jest chemoterapia z użyciem ribawiryny, która hamuje namnażanie się wirusa. Skuteczna jest również metoda mikroszczepienia w warunkach *in vitro*, jednakże jest ona pracochłonna, trudna technicznie i wymagająca precyzji.

## Literatura

- [1] Barba M., Clark M. R. 1986. Detection of strains of apple chlorotic leafspot virus by F(ab')<sub>2</sub>-based indirect ELISA. *Acta Hort.* 193: 297–304.
- [2] Barba M., Martino L., Lauretti F. 1992. Comparison of the different methods to produce virus free stone fruits. *Acta Hort.* 309: 385–392.
- [3] Cambra M., Llàcer G., Aramburu J., Lavina A. 1986. Translocation of chlorotic leaf spot and prunus necrotic ring spot viruses in apricot and peach seedlings. *Acta Hort.* 193: 233–240.
- [4] Cambra M., Llàcer G., Perez de Sanroman C. 1983. Use of enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for virus detection on stone fruit trees in Spain. *Acta Hort.* 130: 145–150.
- [5] Candresse T., Lanneau M., Revers F., Grasseau N., Macquaire G., German S., Malinowski T., Dunez J. 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the apple chlorotic leafspot virus. *Acta Hort.* 386: 136–147.
- [6] Cieślińska M. 1998. Charakterystyka i metody wykrywania wirusa chlorotycznej plamistości liści jabłoni (ACLSV) w drzewach owocowych. Praca doktorska, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice.
- [7] Cieślińska M. 2002. Elimination of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. *Acta Hort.* (w druku).

- [8] Cieślińska M., Malinowski T., Zawadzka B. 1995. Studies on several strains of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) isolated from different fruit tree species. *Acta Hort.* 386: 63–71.
- [9] Cieślińska M., Zawadzka B. 1999. Preliminary results of investigation on elimination of viruses from apple, pear and raspberry using thermotherapy and chemotherapy in vitro. *Phytopathol. Pol.* 17: 41–48.
- [10] Deogratias J.M., Dosba F., Lutz A. 1989. Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic ringspot virus and apple chlorotic leaf spot virus in tissue cultured sweet cherry. *Can. J. Plant Pathology* 11: 332–336.
- [11] Desvignes J.C., Boyé R. 1989. Different diseases caused by the chlorotic leaf spot virus on the fruit trees. *Acta Hort.* 235: 31–38.
- [12] Desvignes J.C., Boyé R., Cornaggia D., Grasseau N. 1992. Quick detection of the principal apple and pear virus diseases. *Acta Hort.* 309: 377–384.
- [13] Detienne G., Delbos R., Dunez J. 1981. Use and versatility of the immunoenzymatic ELISA procedure to the detection of different strains of apple chlorotic leaf spot. *Acta Hort.* 94: 39–45.
- [14] Di Terlizzi B., Murolo O., Savino V., Digiario M. 1992. Viruses of peach, plum and apricot in Apulia. *Acta Hort.* 309: 367–372.
- [15] Dosba F., Lansac M., Huguet J.G., Gall H. 1986. Incidence of apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) and prunus necrotic ring spot virus (NRSV) on apricot cv. Canino grafted on two different seedling rootstocks. *Acta Hort.* 193: 101–106.
- [16] Flegg C.L., Clark M.F. 1979. The detection of apple chlorotic leaf spot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Appl. Biol.* 91: 61–65.
- [17] Fridlund P.R. 1986. Symptom intensities in pear and quince cultivars incited by the virus that causes pear ring pattern mosaic and apple chlorotic leaf spot. *Zast. Blija* 4: 327–333.
- [18] Fuchs E. 1980. Serological detection of apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) and apple stem grooving virus (SGV) in apple trees. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 15: 69–73.
- [19] Fuchs E. 1982. Studies of the development of concentration of apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) and apple stem grooving virus (SGV) in apple trees. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 17: 23–27.
- [20] Fuchs E., Grüntzig M., Al. Kai B. 1988. Der serologische Nachweis mechanisch übertragbarer Viren des Kern- und Steinobstes. *Nachrichtenbl. Dt. Pflanzenschutz* 10: 208–211.
- [21] Gabova R.N. 1989. Virus free pome fruits through meristem tip culture. *Acta Hort.* 235: 69–76.
- [22] Gella R., Cambra R. 1989. Histopathological abnormalities in the compatible graft union 'cherry red' (*Prunus persica* (L.) Batsch/'Constanti' (*P. domestica* L. or *P. insititia*). *Acta Hort.* 235: 181–187.
- [23] German S., Candresse T., Lanneau M., Huet J.C., Pernellet J.C., Dunez J. 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of apple chlorotic leaf spot closterovirus. *Virology* 179: 104–111.
- [24] German S., Candresse T., Le Gall O.T., Lanneau M., Dunez J. 1992. Analysis of the dsRNAs of apple chlorotic leaf spot virus. *J. Gen. Virol.* 73: 767–773.
- [25] German-Retana S., Bergey B., Delbos R.P., Candresse T., Dunez J. 1997. Complete nucleotide sequence in the genome of a severe cherry isolate of apple chlorotic leaf spot trichovirus (ACLSV). *Arch. Virol.* 142: 833–841.

- [26] Hansen A.J., Lane W.D. 1985. Elimination of chlorotic leaf spot virus from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Dis.* 69: 134–135.
- [27] Janečková M. 1995. Eliminace viru jabloni kombinací termoterapie in vivo se segmentovými pupenovými kulturami in vitro. *Vedeckie Prace Ovocnarskie* 14: 45–50.
- [28] Jelkmann W., Kunze L. 1995. Plum pseudopox in german prune after infection with an isolate of Apple chlorotic leaf spot virus causing plum line pattern. *Acta Hort.* 386: 122–124.
- [29] Juárez J., Arregui J.M., Camarasa E., Cambra M., Llácer G., Ortega C., Navarro L. 1989. Recovery of virus-free peach trees from selected clones by shoot-tip grafting in vitro. *Acta Hort.* 235: 77–83.
- [30] Kalashjan J.A., Lipartia Z.M. 1986. Apple chlorotic leaf spot (CLSV) in affected tissues and the possibility of its detection by immune electron microscopy (IEM). *Acta Hort.* 193: 311–318.
- [31] Kerlan C., Mille B., Dunez J. 1981. Immunosorbent electron microscopy for detection apple chlorotic leaf spot and plum pox viruses. *Phytopathology* 71: 400–404.
- [32] Knapp E., Hanzer V., Weiss H., da Camara Machado A., Wang Q., Weiss B., Katinger H., Laimer da Camara Machado M. 1995. Distribution of apple chlorotic leafspot virus in apple shoots cultivated in vitro. *Acta Hort.* 386: 187–194.
- [33] Knapp E., Da Camara Machado A., Pühringer H., Wang Q., Hanzer V., Weiss H., Weiss B., Katinger H., Laimer da Camara Machado M. 1995. Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of *Malus* sp. and *Prunus* sp. *J. Virol. Methods* 55: 157–173.
- [34] Koike H., Makita H., Tsukahara K. 1993. Effect of an apple chlorotic leaf spot virus free M 9 rootstocks on the growth of apple trees. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 62: 499–504.
- [35] Kryczyński S., Szyndel M.S., Paduch-Cichal E., Głowacki M. 1995. Virus-infection status of some apple propagative material plantations in Poland. *Phytopathol. Pol.* 10: 75–84.
- [36] Lister R.M., Bar-Joseph M. 1981. Closteroviruses. W: Kurstak E. (red.) Handbook of Plant Virus Infections Comparative Diagnosis. Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam-New York-Oxford: 809–844.
- [37] Malinowski T., Cieślińska M., Zawadzka B. 1997. Characterization of monoclonal antibodies against apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) and their application for detection of ACLSV and identification of its strains. *Phytopathol. Pol.* 14: 35–40.
- [38] Malinowski T., Komorowska B., Cieślińska M., Zawadzka B., Candresse T. 1998. Characterization of SX/2, an apple chlorotic leaf spot virus isolate showing unusual coat protein properties. *Acta Hort.* 472: 43–50.
- [39] Martelli G.P., Candresse T., Namba S. 1994. Trichovirus a new genus of plant viruses. *Arch. Virol.* 134: 451–455.
- [40] Mink G.I. 1989. Apple chlorotic leaf spot. W: „Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders” red. P.R. Fridlund. Pulman, Washington: 8–19.
- [41] Navarro L., Llácer G., Cambra M., Arregui J.M., Juárez J. 1983. Shoot-tip grafting in vitro for elimination of viruses in peach plants (*Prunus persica* BATSCH.). *Acta Hort.* 130: 185–192.
- [42] Nemchinov L., Hadidi A., Candresse T., Foster J. A., Verderevskaya T. 1995. Sensitive detection of apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR or multiplex IC-RT-PCR. *Acta Hort.* 386: 51–62.

- [43] Németh M. 1986. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. Akademiai Kiado, Budapest.
- [44] Pasquini G., Fraggioli F., Pilotti M., Barba M. 1997. Characterization of apple chlorotic leafspot virus isolates from central Italy. *Acta Hort.* 472: 195–202.
- [45] Paunović S. 1989. Properties of two apple chlorotic leaf spot virus isolates. *Acta Hort.* 235: 39–47.
- [46] Pena-Iglesias A., Ayuso P. 1975. Preliminary identification of the virus producing Spanish apricot pseudopox (Viruela) and apricot mosaic diseases. *Acta Hort.* 44: 255–266.
- [47] Poul F., Dunez J. 1990. Use of monoclonal antibodies for the identification of different antigenic domains in apple chlorotic leaf spot virus. *Arch. Virol.* 114: 191–202.
- [48] Sato K., Yoshikawa N., Takahashi T. 1993. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of apple chlorotic leaf spot virus. *J. Gen. Virol.* 74: 1927–1931.
- [49] Sawamura K., Arai M., Yamashita K. 1988. A peach latent strain of apple chlorotic leaf spot virus isolated from a peach tree. *Bull. of the Faculty of Agriculture, Hiroshaki-University* 50: 16–21.
- [50] Sawamura K., Harda Y., Kikuchi T., Ogawa J. M. 1993. The apple industry in Japan. A historical sketch and diseases specific to the region. *Plant Dis.* 6: 546–552.
- [51] Thomas B.J. 1983. The particle length of an isolate of apple chlorotic leaf spot virus from *Prunus domestica*. *Phytopath. Z.* 106: 233–238.
- [52] Topchiiska M. 1995. Apple chlorotic leaf spot virus in *Prunus* spp. in Bulgaria. *Plant Sci.* 32: 24–27.
- [53] Waterworth H. 1993. Processing foreign plant germplasm at the National Plant Germplasm Quarantine Center. *Plant Dis.* 9: 854–860.
- [54] Yoshikawa N., Takahashi T. 1988. Properties of RNAs and Proteins of Apple Stem Grooving and Apple Chlorotic Leaf Spot Viruses. *J. Gen. Virol.* 69: 241–245.

## **Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) – polyphagous pathogen of fruit trees**

---

**Key words:** ACLSV, host plants, detection, control

### **Summary**

On the basis of reviewed literature the following subjects were discussed:

- occurrence and spreading of ACLSV,
- ACLSV particle morphology and its biochemical properties,
- symptoms on the host plants,
- methods of ACLSV detection,
- methods of ACLSV control.