

Latvijas Biozinātņu un Tehnoloģiju universitāte  
*Latvia University of Life Sciences and Technologies*

Lauksaimniecības fakultāte  
*Faculty of Agriculture*



Mg. biol. **Neda Zuļģe**

**ĀBEĻU HĻOROTISKĀS LAPU PLANKUMAINĪBAS  
VĪRUSA EPIDEMIOĻĢIJA UN ĢENĒTISKĀ  
DAUDZVEIDĪBA LATVIJĀ UN AUGĻKOKU  
ATVESEĻOŠANAS IESPĒJAS**

***EPIDEMIOLOGY AND GENETIC DIVERSITY OF APPLE  
CHLOROTIC LEAF SPOT VIRUS IN LATVIA AND ITS  
ELIMINATION POSSIBILITIES FROM FRUIT TREES***

Promocijas darba KOPSAVILKUMS  
zinātnes doktora grāda (Ph.D.) iegūšanai lauksaimniecības, meža  
un veterinārās zinātnēs

***SUMMARY***

*of the Doctoral thesis for the Doctoral degree of Science (Ph.D.)  
in Agriculture, Forestry and Veterinary Sciences*

Jelgava  
2023

## **Promocijas darba zinātniskās vadītājas/ Scientific supervisors:**

Dr.habil.agr. Ināra Turka

Ph.D. Inga Moročko-Bičevska

**Promocijas darbs izstrādāts** APP “Dārzkopības institūts”, doktorantūras studiju ietvaros Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes Lauksaimniecības fakultātē laika posmā no 2008. līdz 2022. gadam.

*The research was elaborated at the Institute of Horticulture. The doctoral studies were carried out at Latvia University of Life Sciences and Technologies, Faculty of Agriculture, in the period from 2008 to 2022.*

### **Oficiālie recenzenti / Official reviewers:**

1. Prof., Dr.biol. Biruta BANKINA, Augsnes un augu zinātņu institūta vadošā pētniece/ *Professor and senior researcher at Institute of Soil and Plant Sciences;*
2. Dr. Ingrīda MAŽEIKIENĒ, Lietuvas lauksaimniecības un mežsaimniecības pētniecības centra, Dārzkopības institūta pētniece/ *Researcher at Lithuanian Research Centre for Agriculture and forestry, Institute of Horticulture;*
3. Dr.biol. Dainis RUŅĢIS, LVMI “Silava” vadošais pētnieks/ *Senior researcher of Latvian State Forest Research Institute “Silava”*

**Promocijas darba aizstāvēšana** paredzēta Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes Lauksaimniecības un zivsaimniecības zinātnes, mežzinātnes ar specializāciju “Lauksaimniecība” promocijas padomes atklātajā sēdē 2023. gada 30. jūnijā plkst. 10.00, Jelgavā, Lielā iela 2, 123. auditorijā./ *The defence of the thesis is an open session of the Promotion board of Agriculture, Forestry and Fisheries with specialisation “Agriculture” of Latvia University of Life Sciences and Technologies will be held on 30 June 2023 at 10:00 am in room 123, Lielā street 2, Jelgava, Latvia.*

**Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu** var iepazīties Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes Fundamentālajā bibliotēkā, Jelgava, Lielā iela 2 un interneta vietnē: <https://llu.fb.llu.lv/> *The thesis is available at the Fundamental Library of Latvia University of Life Sciences and Technologies, Lielā street 2, Jelgava, Latvia and website [https://llu.fb.llu.lv.](https://llu.fb.llu.lv/)*

**Atsauksmes sūtīt** Lauksaimniecības un zivsaimniecības zinātnes nozares, mežzinātnes specializācijas “Lauksaimniecība” promocijas padomes sekretārei Ingrīdai Augšpolei, Lielā iela 2, Jelgava, LV – 3001 vai e-pastā: [ingrida.augspole@llu.lv](mailto:ingrida.augspole@llu.lv)/ *References are welcome to be sent to Ingrīda Augšpole, the Secretary of the Promotion Board, Latvia University of Life Sciences and Technologies, Lielā street 2, Jelgava, LV – 3001, Latvia or by e-mail: [ingrida.augspole@llu.lv.](mailto:ingrida.augspole@llu.lv)*

# SATURS/ CONTENT

SATURS/ CONTENT .....	3
SAĪSINĀJUMI/ ABBREVIATIONS .....	6
1. DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS .....	7
1.1. Tēmas aktualitāte.....	7
1.2. Promocijas darba mērķis, uzdevumi un tēzes.....	7
1.3. Pētījuma novitāte.....	8
1.4. Promocijas darba aprobācija.....	8
1.5. Promocijas darba uzbūve.....	10
2. MATERIĀLI UN METODES.....	11
2.1. Augu materiāls un izmēģinājumu apstākļi .....	11
2.1.1. Dārzu apsekošana un paraugu ievākšana .....	11
2.1.2. Lauka izmēģinājuma apstākļi.....	13
2.1.3. Kandidātaugu izveide un uzturēšana siltumnīcā .....	14
2.2. Kandidātaugu atvaseļošana ar termoterapiju .....	14
2.3. Vīrusa diagnostikas metodes .....	15
2.3.1. Cietfāzes enzīmu imunosorbences tests .....	15
2.3.2. RNS ekstrakcija un RT-PCR.....	16
2.3.3. Vīrusu pārbaude ar kokveida indikatoraugiem .....	17
2.4. Ģenētiskās analīzes.....	18
2.4.1. Sekvencēšana un sekvenču analīze .....	18
2.4.2. Rekombināciju noteikšana un filoģenētiskās analīzes .....	19
2.5. Datu statistiskā analīze .....	19
2.5.1. Aprakstošā statistika .....	19
2.5.2. Koku augšanas un ražas parametru apstrāde.....	20
REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	21
3.1. ACLSV sastopamība augļu dārzos un savvaļā .....	21
3.2. Rekombināciju analīze ACLSV CP gēnā.....	24
3.3. ACLSV ģenētiskā daudzveidība.....	25
3.4. ACLSV filoģenēze un ģenētiskie tipi.....	26

3.5. ACLSV ietekme uz ražu un veģetatīvo augšanu .....	32
3.6. ACLSV eliminācijas iespējas un termoterapijas efektivitāte .....	36
SECINĀJUMI .....	40
PRIEKŠLIKUMI.....	41
PATEICĪBAS.....	42
1. GENERAL DESCRIPTION OF THE THESIS .....	43
1.1. Relevance of the topic .....	43
1.2. Research aim, objectives and theses.....	44
1.3. Scientific novelty of the study.....	45
1.4. Approbation of research results.....	45
1.5. Thesis structure .....	45
2. MATERIALS AND METHODS .....	46
2.1. Plant material and conditions for experiments .....	46
2.1.1. Survey of orchards and collection of samples.....	46
2.1.2. Field trial conditions .....	46
2.1.3. The establishment and maintenance of candidate plants in the greenhouse .....	47
2.2. Virus elimination in candidate plants by thermotherapy .....	48
2.3. Virus diagnostic methods .....	48
2.3.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	48
2.3.2. RNA extraction and RT-PCR.....	49
2.3.3. Screening of viruses in candidate plants with woody indicator plants.....	49
2.4. Genetic analysis.....	50
2.4.1. Sequencing and sequence analysis.....	50
2.4.2. Detection of recombination events and phylogenetic analyses .....	51
2.5. Statistical analysis of the data.....	52
2.5.1. Descriptive statistics .....	52
2.5.2. Processing of tree growth and yield parameters.....	52
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	53

3.1. Occurrence of ACLSV in orchards and in the wild.....	53
3.2. Recombination analysis of the ACLSV CP gene .....	55
3.3. Genetic diversity of ACLSV .....	56
3.4. ACLSV phylogeny and genetic types .....	57
3.5. Impact of ACLSV on yield and vegetative growth .....	60
3.6. Possibilities for ACLSV elimination and the effectiveness of thermotherapy.....	62
CONCLUSIONS .....	66
RECOMMENDATIONS .....	67
ACKNOWLEDGEMENTS .....	68

## SAĪSINĀJUMI/ ABBREVIATIONS

aa	– aminoskābe/ <i>amino acid</i>
ACLSV	– ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīruss/ <i>apple chlorotic leaf spot virus</i>
Ala	– alanīns/ <i>alanine</i>
ApMV	– ābeļu mozaīkas vīruss/ <i>apple mosaic virus</i>
ASGV	– ābeļu stumbra rievainības vīruss/ <i>apple stem grooving virus</i>
ASPV	– ābeļu stumbra bedrainības vīruss/ <i>apple stem pitting virus</i>
bp	– bāzu pāris/ <i>base pair</i>
CP	– vīrusa apvalka proteīns/ <i>coat protein</i>
dsRNS	– divpavedienu RNS/ <i>double-stranded RNA</i>
ELISA	– cietfāzes enzīmu imunosorbences tests/ <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPPO	– Eiropas un Vidusjūras augu aizsardzības organizācija/ <i>European and Mediterranean Plant Protection Organization</i>
Leu	– leicīns/ <i>leucine</i>
Met	– metionīns/ <i>methionine</i>
MP	– vīrusa pārvietošanās proteīns/ <i>movement protein</i>
nt	– nukleotīdi/ <i>nucleotide</i>
OD	– optiskais blīvums/ <i>optical density</i>
ORF	– atvērtās lasīšanas rāmis/ <i>open reading frame</i>
PDV	– plūmju pundurainības vīruss/ <i>plum dwarf virus</i>
Phe	– fenilalanīns/ <i>phenylalanine</i>
PNRSV	– plūmju nekrotiskās gredzenplankumainības vīruss/ <i>plum necrotic ringspot virus</i>
PPV	– plūmju baku vīruss/ <i>plum pox virus</i>
RT-PCR	– reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcija/ <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
Ser	– serīns/ <i>serine</i>
sgRNS	– subgenomiskā RNS/ <i>subgenomic RNA</i>
TCSA	– stumbra šķērsriezuma laukums/ <i>trunk cross-sectional area</i>
Thr	– treonīns/ <i>threonine</i>
Tyr	– tirozīns/ <i>tyrosine</i>
Val	– valīns/ <i>valine</i>

# 1. DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

## 1.1. Tēmas aktualitāte

Ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīrusam ir plaša sastopamība daudzās pasaules valstīs, kā arī samērā plašs ekonomiski nozīmīgu saimniekaugu loks. Tas inficē ne tikai ābeles, bumbieres, plūmes un ķiršus, bet ir konstatēts arī daudziem citiem Rosaceae dzimtas augļu kokiem un dekoratīvajiem augiem, kurus arvien plašāk izmanto apzaļumošanā, vai arī tiem ir pieaugoša nozīme auglīkopības nozarē. Lai gan vienīgais zināmais vīrusa transmisijas veids ir veģetatīvā pavairošana, tā klātbūtne ir konstatēta arī vairākās savvaļas sugās. Latvijā iepriekšējos pētījumos veiktās standarta šķirņu un klona potcelmu pārbaudes, pielietojot dubultās acošanas metodi uz indikatoraugiem, liecināja, ka 66.7% no visiem pārbaudītajiem kokiem ir inficēti ar latento vīrusu komplekso infekciju – ACLSV, ASGV un ASPV (Miltiņš & Kilēvica, 1984). Daudzi *Malinae* augi (*Amelanchier* × *spicata*, *Crataegus spp.*, *Malus spp.*) nekontrolēti izplatās savvaļā un kļuvuši par invazīvajiem svešzemju augiem (Stalažs, 2021). Tāpēc ir svarīgi apzināt arī savvaļā augošos vīrusa saimniekaugus, kuri var būt potenciālie infekcijas avoti. Vīrusa izpēte savvaļas augos var ļaut noskaidrot, vai eksistē cits vīrusa transmisijas veids, bez veģetatīvās pavairošanas, un vai vīruss izplatās arī savvaļā. Šobrīd nav zināms, cik plaši ACLSV ir izplatīts augļu dārzos, vai tas ir sastopams arī savvaļā augošajos Rosaceae dzimtas augos un vai pastāv starp saimniekaugiem atšķirīgi vīrusa genotipi. Latvijā līdz šim nav ieviesta atvaseļota stādmateriāla aprites sistēma, kas izslēgtu inficēta materiāla izmantošanu jaunu augļu dārzu ierīkošanā un ļautu paaugstināt ražas potenciālu. Jauktas vīrusu infekcijas gadījumā ražas daudzums var samazināties līdz pat 60% (Campbell, 1962; Posnette et al., 1963), bet nav zināms vai ACLSV, bez citu vīrusu klātbūtnes, arī negatīvi ietekmē ābeļu veģetatīvo augšanu un ražas daudzumu un cik būtiski tas spēj ietekmēt Latvijā audzētās šķirnes. Lai ierobežotu vīrus slimību izplatību un iegūtu veselu vīrusbrīvu stādāmo materiālu, sākotnēji ir nepieciešams izveidot atvaseļotu mātes augu kolekciju, kuru tālāk varētu izmantot pavairošanā un jaunu augļu dārzu ierīkošanā.

## 1.2. Promocijas darba mērķis, uzdevumi un tēzes

Promocijas darba mērķis

Noteikt ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīrusa (ACLSV) izplatību Latvijā un tā ģenētisko daudzveidību, noskaidrot vīrusa ietekmi uz augļu koku attīstību un ražu, kā arī izvērtēt termoterapijas efektivitāti augļu koku atvaseļošanā.

Atbilstoši pētījuma mērķim izvirzīti četri pētnieciskie uzdevumi.

1. Noteikt ACLSV izplatību Latvijas novados, ābeļu, bumbieru un plūmjū stādījumos, saistībā ar audzēto šķirņu un potcelmu sortimentu.
2. Raksturot ACLSV ģenētisko daudzveidību un ģenētiskos tipus ābeļu, bumbieru un plūmjū izolātiem.
3. Izvērtēt ACLSV ietekmi uz augļu koku augšanu un ražu.
4. Noskaidrot termoterapijas efektivitāti augļu koku atveseļošanā saistībā ar vienu vai vairāku vīrusu klātbūtni augos.

Darba hipotēze

Ābeļu šķirņu introdukcija un potenciāli inficēta stādmateriāla izmantošana dārzu ierīkošanā ir veicinājusi plašu un nekontrolētu ACLSV izplatību augļu dārzos, kā rezultātā ir attīstījušies ģenētiski daudzveidīgi vīrusa tipi, kas negatīvi ietekmē koku veģetatīvo augšanu un ražu, kā arī pazemina augu atveseļošanas efektivitāti ar termoterapiju.

Promocijas darba tēzes

1. ACLSV ir retāk izplatīts augļu koku stādījumos, kuros ir izmantoti sēklaudžu potcelmi.
2. Vadoties pēc vīrusa proteīna apvalka kodējošo aminoskābju sekvenču ko-variācijām, vīrusa izolātus var sadalīt vairākos ģenētiskos tipos.
3. ACLSV būtiski ietekmē augļu koku attīstību un ražas daudzumu.
4. Termoterapija ir efektīvs vīrusu eliminācijas veids augiem, kas ir inficēti tikai ar vienu vīrusu.

### 1.3. Pētījuma novitāte

Promocijas darbā pirmo reizi Latvijā analizēta ACLSV izplatība augļu dārzos un savvaļas augos, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes. Šis pētījums sniedz jaunus datus par ACLSV ģenētisko daudzveidību un ģenētisko tipu izplatību dažādiem saimniekaugiem, kā arī pirmo reizi ir izvērtētas Latvijā audzēto un selekcionēto šķirņu atveseļošanas iespējas, izmantojot termoterapiju.

### 1.4. Promocijas darba aprobācija

Pētījumu rezultāti ir apkopoti piecās publikācijās.

- I. **Pūpola, N.,** Moročko-Bičevska, I., Kāle, A. & Zeltiņš, A. (2011). Occurrence and diversity of pome fruit viruses in apple and pear



- orchards in Latvia. *Journal of Phytopathology*, 159 (9), 597 – 605. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2011.01812.x
- II. Gospodaryk, A., Moročko-Bičevska, I., **Pūpola, N.** & Kāle, A. (2013). Occurrence of stone fruit viruses in plum orchards in Latvia. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, 67 (2), 116 – 123. DOI: 10.2478/prolas-2013-0018
- III. **Zuļģe, N.**, Gospodaryk, A. & Moročko-Bičevska, I. (2022). Genetic diversity and phylogenetic relationships of apple chlorotic leaf spot virus isolates from *Malus*, *Pyrus* and *Prunus* hosts in Latvia. *Plant Pathology*, 00, 1 – 12. Available from: <https://doi.org/10.1111/ppa.13712>
- IV. **Zuļģe, N.**, Rubauskis, E., Missa, I., Reveliņa, D. & Borisova, I. (2022). Evaluation of apple chlorotic leaf spot virus impact on fruit yield and vegetative growth in apple cultivars ‘Antonovka’ and ‘Gita’. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, 76 (4), 495 – 499. DOI: 10.2478/prolas-2022-0076
- V. **Zuļģe, N.**, Kāle, A., Gospodaryk, A., Vēvere, K. & Moročko-Bičevska, I. (2017). Establishment of nuclear stock collections for apple and pear in Latvia. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, 71 (3), 156 – 165. DOI: 10.1515/prolas-2017-0027

Pētījuma rezultāti prezentēti astoņās zinātniskajās konferencēs.

1. **Zuļģe, N.**, Rubauskis, E., Missa, I., Reveliņa, D. & Borisova, I. (2021). Evaluation of apple chlorotic leaf spot virus impact on fruit yield and vegetative growth. *Sustainable Horticulture from Plant to Product: "Challenges in Temperate Climate"*, August 25 – 25, 2021, Dobeles, Latvia. (Mutisks ziņojums).
2. **Zuļģe, N.**, Kāle, A., Gospodaryk, A., Vēvere, K. & Moročko-Bičevska, I. (2017). Establishment of nuclear stock collections for apple and pear in Latvia. *Sustainable Fruit Growing: From Plant to Product*, August 17 – 18, 2016, Rīga, Latvia. (Stenda referāts).
3. Kāle, A., Gospodaryk, A., **Pūpola, N.** & Moročko-Bičevska, I. (2012). Establishment of virus-free planting material for pome fruits in Latvia. *22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops*. June 3 – 8, 2012, Rome, Italy (Mutisks ziņojums).
4. **Pūpola, N.**, Gospodaryk, A. & Kāle, A. (2012). Genetic diversity of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) in fruit crops. *22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops*. June 3 – 8, 2012, Rome, Italy (Stenda referāts).

5. Gospodaryk, A., **Pūpola, N.**, Kāle, A. & Moročko-Bičevska, I. (2012). The monitoring of the occurrence of four common viruses in plum cultivars in Latvia. 22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. June 3 – 8, 2012, Rome, Italy (Stenda referāts).
6. **Pūpola, N.** & Gospodaryk, A. (2011). Heterogeneity of apple chlorotic leaf spot virus isolates originated in Latvia and Ukraine. XV International Congress of Virology, September 11 – 16, 2011, Sapporo, Japan (Stenda referāts).
7. **Pūpola, N.**, Moročko-Bičevska, I. & Kāle, A. (2011). Occurrence of economically important viruses in pome fruit orchards in Latvia and evaluation of their genetic diversity. Final meeting of Cost Action 864 “Pome Fruit Health/Combining Traditional and Advanced Strategies for Plant Protection in Pome Fruit Growing”, February 1–3, 2011, Hasselt, Belgium (Stenda referāts).
8. **Pūpola, N.**, Predajna, L., Kāle, A. & Glasa, M. (2010). Analysis of apple chlorotic leaf spot virus incidence in *Prunus* trees infected with plum pox virus. International Symposium on Plum Pox Virus, September 5 – 9, 2010. Sofia, Bulgaria (Stenda referāts).
9. **Pūpola, N.**, Kāle, A. & Moročko-Bičevska, I. (2008). Distribution of ApMV, ACLSV, ASGV and ASPV in apple and pear orchards in Latvia. 9th International Congress of Plant Pathology, August 24 – 30, 2008, Turin, Italy (Stenda referāts).
10. **Pūpola, N.**, Kāle, A. & Moročko-Bičevska, I. (2008). Occurrence of viruses in apple and pear orchards in Latvia. Sustainable Fruit Growing: From Plant to Product, May 28 – 31, 2008, Jūrmala, Latvia (Mutisks ziņojums).

## 1.5. Promocijas darba uzbūve

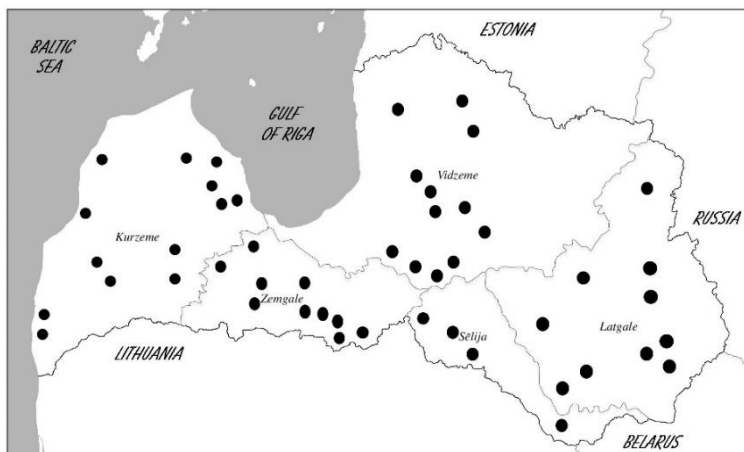
Promocijas darbu veido piecas publikācijas. Pirmajās divās publikācijās (I un II publikācija) ir analizēta ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīrusa izplatība ābeļu, bumbieru un plūmju stādījumos. ACLSV ģenētiskā daudzveidība ir raksturota trešajā (III) publikācijā. Ceturtajā (IV) publikācijā ir analizēta ACLSV ietekme uz divām ābeļu šķirnēm – ‘Gita’ un ‘Antonovka’, bet piektajā (V) publikācijā ir vērtētas ābeļu un bumbieru augļu koku atveseļošanas iespējas ar termoterapiju.

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

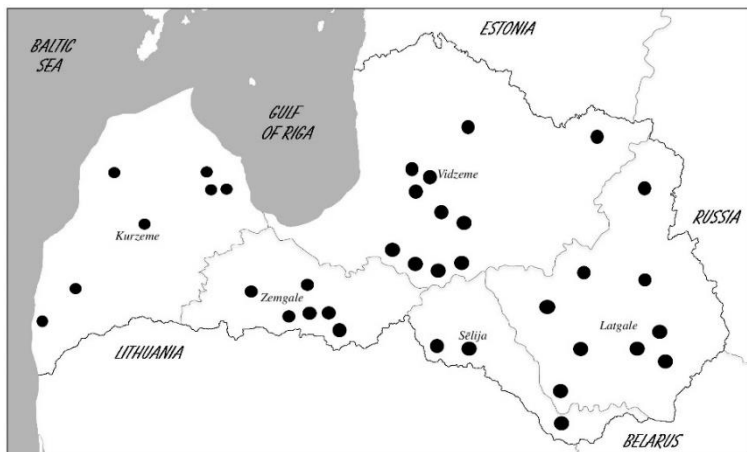
### 2.1. Augu materiāls un izmēģinājumu apstākļi

#### 2.1.1. Dārzu apsekošana un paraugu ievākšana

Paraugu vākšana ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīrusa (ACLSV) izplatības noteikšanai ābeļu un bumbieru augļu dārzos veikta 2007. gada pavasarī, no maija līdz jūlijam. Kopumā Latvijā apsekoti 50 ābeļu un 36 bumbieru augļu dārzi (2.1. un 2.2. att.) un ģenētisko resursu kolekcijas un ievākti 870 lapu paraugi (viens paraugs no koka) no 115 dažādiem ābeļu (*Malus domestica* (Suckow) Borkh.) genotipiem un 248 paraugi no 44 dažādiem bumbieru (*Pyrus communis* L.) genotipiem (I publikācija).

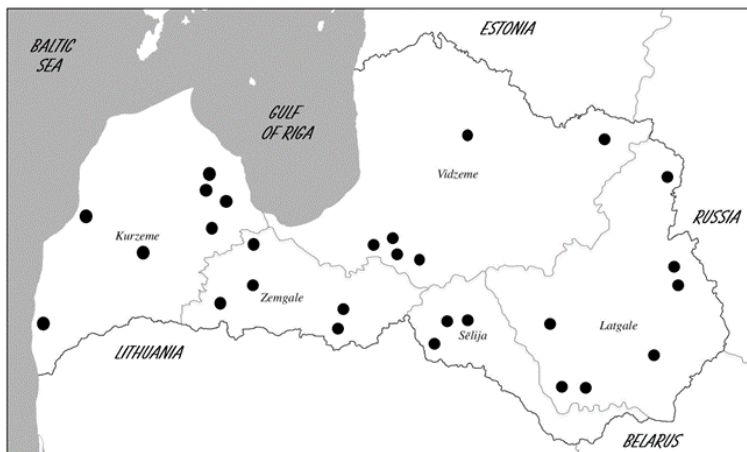


2.1. att. 2007. gadā apsekoto ābeļu dārzu izvietojums Latvijā/  
Fig. 2.1. Location of apple orchards surveyed in Latvia in 2007



2.2. att. 2007. gadā apsekoto bumbieru dārzu izvietojums Latvijā/  
 Fig. 2.2. Location of pear orchards surveyed in Latvia in 2007

Plūmju stādījumi apsekoti 2008. gada maijā, kopumā apsekoti 28 dārzi un ģenētisko resursu kolekcijas (2.3. att.). Ievākti 654 lapu paraugi no 92 genotipiem, galvenokārt no mājas plūmēm (*Prunus domestica* L.), ķiršveida plūmēm (*P. cerasifera* Ehrh.) un *Prunus* ģints hibrīdiem (II publikācija). Paraugi galvenokārt ņemti no 1990-tajos gados stādītajiem augļu dārziem, kuros audzē introducētas šķirnes. Lapas ievāktas no dažādu šķirņu kokiem, kuriem novēroja vīrusu infekcijas pazīmes un kuri bija bez simptomiem.



2.3. att. 2008. gadā apsekoto plūmju dārzu izvietojums Latvijā/  
 Fig. 2.3. Location of plum orchards surveyed in Latvia in 2008

ACLSV ģenētiskās daudzveidības noteikšanai paraugi ievākti no savvaļas biotopiem, ģenētisko resursu kolekcijām un piemājas dārziem (Kurzemes, Zemgales un Vidzemes vēsturiskajos novados), laika posmā no 2008. līdz 2021. gadam. Kopumā ievākti 262 paraugi, no kuriem 216 paraugi bija no dažādām Rosaceae sugām, galvenokārt no kultivētām ābelēm, bumbierēm, plūmēm, aprikozēm, un 46 paraugi no savvaļā augošajiem *Amelanchier*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Malus*, *Prunus* un *Sorbus* ģints augiem. Salīdzinājumam papildu iekļauti 44 kultivēto ābeļu un bumbieru lapu paraugi no Ukrainas (The Institute of Horticulture, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine) (III publikācija).

Katrs paraugs sastāvēja no desmit pilnībā izplaukušām lapām, kas ievāktas no galvenajiem vainagzariem. Paraugi ievietoti plastmasas maisos un turēti aukstumkastē līdz nogādāšanai laboratorijā, kur tie nekavējoties analizēti vai arī sasaldēti šķidrā slāpekļī un uzglabāti saldētavā  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā. No katra parauga ievāktās lapas sadalītas divās daļās, kur viena daļa analizēta ar ELISA un otra daļa ar RT-PCR.

### 2.1.2. Lauka izmēģinājuma apstākļi

Lai izpētītu ACLSV ietekmi uz ābeļu augšanu un ražu, salīdzināti ACLSV inficēto un vīrus-negatīvo koku augšanas parametri (IV publikācija). Pētījums veikts Dārzkopības institūtā (DI; Lat: 56.6092713 N, Lon: 23.3064627 E) no 2012. līdz 2020. gadam. Pētījumam izvēlētas divas ābeļu šķirnes: 'Gita' (Latvijas izcelsmes) un 'Antonovka' (Krievijas izcelsmes), uzacotas uz vīrusbrīva B396 potcelma. Acošanai izmantots standarta izejmateriāls (DI), kas atlasīts gan no ACLSV inficētiem, gan no vīrus-negatīviem kokiem. Darbā izmantots vīrusbrīvs potcelms B396, kas iegūts no "Lodder Unterlagen" audzētavas (Vācija). Novērtēšanas periodā ierīkotā izmēģinājuma kokiem vīrusa statuss pārbaudīts divas reizes ar RT-PCR.

Izmēģinājums kopts saskaņā ar ilgtspējīgu (integrētu) audzēšanas sistēmu, ieskaitot integrētu augu aizsardzību. Koku lapotne veidota, pielāgojot slaidās vārpstas (SS) principu. Stādīšanas attālums  $1.5 \times 4\text{ m}$ . Izmēģinājums ierīkots pēc randomizēta principa, trīs atkārtojumos, izmantojot trīs kokus no vīrus-negatīvajiem augiem un trīs kokus no ACLSV inficētiem augiem. Izmēģinājuma augsne: velēnu-gleja ar smilšmālu, pH KCl 6.6. Organiskās vielas saturs 2.0%, augiem pieejamais fosfors ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) un kālijs ( $\text{K}_2\text{O}$ ) – attiecīgi  $77\text{ mg kg}^{-1}$  un  $154\text{ mg kg}^{-1}$  (noteikts pēc Egnera-Rīma metodes (Egnér et al., 1960)). Mēslošana veikta, pamatojoties uz augsnes analīzēm. Katras augšanas sezonas pirmajā pusē uz koku rindu virsmas dots slāpekli saturošs mēslojums ( $6\text{ gm}^{-2}\text{ N}$ ). Augļu retināšanu nodrošināja mehāniski (ar rokām). Vienu metru platās joslas gar koku rindām smidzinātas ar herbicīdiem un, lai saglabātu augsnes mitrumu, izmantota koksnes šķeldas mulča. Rindu starpās augošā zāle pļauta vairākas reizes sezonā.

### **2.1.3. Kandidātaugu izveide un uzturēšana siltumnīcā**

Saskaņā ar EPPO standartu PM 4/27(1) (EPPO, 1999), atveseļošanai un bāzes materiāla izveidei atlasīti 26 ābeļu un 16 bumbieru genotipi, tostarp introducētās un vietējās šķirnes un perspektīvie hibrīdi (V publikācija). Augu materiāls pavairošanai ievākts Dārzkopības institūta šķirņu kolekcijas dārzos Dobelē un Pūrē. Sākot no 2007. gada, desmit ābeļu un desmit bumbieru šķirnes uzacotas uz viengadīgiem sēklaudžu potcelmiem, kas audzēti konteineros sterilizētā kūdras substrātā un uzturēti insektu necaurīdīgā siltumnīcā.

Lai izvairītos no sala bojājumiem, jaunizveidotos kandidātaugus uzturēja apsildāmā siltumnīcā pie apkārtējās vides temperatūras, ne zemākas par -10 °C. Ziemas laikā siltumnīcas grīda zem konteineriem pārklāta ar 5 cm biežām putuplastu plāksnēm. Konteineri ar substrātu ietīti akmens vatē un augus pārklāja ar agrotīklu (17g/m<sup>2</sup>). Sākot ar 2014. gadu, akmens vates vietā konteineri siltināti ar polietilēna burbulplēvi un augi ietīti dubultā agrotīkla slānī (blīvums 17g/m<sup>2</sup>).

### **2.2. Kandidātaugu atveseļošana ar termoterapiju**

Divgadīgi un viengadīgi kandidātaugi ievietoti augšanas kamerās KBWF240 un KBWF270 (Binder GmbH, Vācija) un EKOCHL 1500 (Angelantoni Life Science, Itālija) 16 h gaismas un 8 h tumsas periodā, ar mitruma līmeni 75% (V publikācija). Pielietotie termoterapijas apstākļi ābelēm un bumbierēm ir apkopoti 2.1. tabulā. 2009. gadā augi uzturēti paaugstinātā temperatūrā 40 dienas, kā ieteikuši vairāki autori (Švarcbahs et al., 1977; Lenz & Lankes, 2006). Termoterapijas laiku 2010. un 2011. gadā pagarināja līdz 70 dienām, pēc Howell et al. (1998) rekomendācijām. Nākamajos gados termoterapijas ilgums un temperatūra naktī samazināta (2.1. tabula).

**Termoterapijas apstākļi un izturēšanas ilgums ābelēm un bumbierēm/  
Conditions and duration of thermotherapy for apples and pears**

Augu kandidātmateriāls/ <i>Candidate material</i>	Termoterapijas gads/ <i>Year of thermotherapy</i>	Temperatūra/ <i>Temperature,</i> °C diena/nakts/ <i>day/night</i>	Ilgums (dienās)/ <i>Duration, (days)</i>	
			Ābeles/ <i>Apple</i>	Bumbieres/ <i>Pears</i>
1/2007/2009	2009	35/ 30	5	5
		38/ 33	10	10
		38/ 38	25	25
2/2008/2010	2010	35/ 30	5	5
		38/ 33	65	65
3/2009/2011	2011	33/ 30	7	7
		38/ 33	63	50
4/2010/2012	2012	35/ 30	7	7
		38/ 33	53	43
5/2012/2013	2013	35/ 30	7	7
		38/ 30	35	35

Lai mazinātu termoterapijas negatīvo ietekmi uz koku dzīvotspēju, kokus vienu nedēļu pirms termoterapijas aklimatizēja 35 °C gaismas periodā un 30 °C tumsas periodā, kā ieteicis Welsh & Nyland (1965). Termoterapijas ilgums aprēķināts no pirmās dienas, kad temperatūru paaugstināja līdz 35 °C. Pēc termoterapijas ābeļu un bumbieru dzinumus gali (~5 mm) nogriezti ar sterilu asmeni un uzpotēti uz vīrusbrīviem sēklaudžu potcelmiem. Uzpotētos augus turēja augšanas kamerā 25 °C temperatūrā zem stikla traukiem, lai uzturētu mitrumu 90% – 95%. Līdzko attīstījās trīs līdz četras jaunās lapas, traukus noņēma un augus pārvietoja siltumnīcā.

## 2.3. Vīrusa diagnostikas metodes

### 2.3.1. Cietfāzes enzīmu imunosorbences tests (ELISA)

Lai veiktu sākotnējo ACLSV skrīningu un diagnostiku (I un II publikācija), izmantots komerciāli pieejams DAS-ELISA diagnostikas komplekts (Bioreba AG, Reinach, Šveice), ar kuru noteikta vīrusspecifisku antigēnu klātbūtne augu šūnsulā. Tests veikts saskaņā ar ražotāja ieteikumiem, izmainot inkubācijas laiku un temperatūru. Lai paaugstinātu testa jutību, inkubācijas laiks pagarināts no četrus stundu inkubācijas pie +30 °C uz 16 stundām pie +4 °C. Kā pozitīvā un negatīvā kontrole testa veikšanai izmantots ražotāja piegādātais liofilizētais augu materiāls. Imunotesta optiskā blīvuma absorbcija mērīta pie 405/ 492 nm ar spektrofotometru Asys Expert 96 (Hitech, Austrija) pēc 30 minūšu, vienas

stundas un divu stundu inkubācijas. Pozitīvo paraugu optiskā blīvuma robežvērtība aprēķināta saskaņā ar ražotāja (Bioreba AG) ieteikto formulu: robežvērtība = (vidējais OD + 3s) × 1.1.

### 2.3.2. RNS ekstrakcija un RT-PCR

Ievāktos lapu paraugus, izmantojot miezeri un piestu, šķidrajā slāpekli saberza smalkā pulverī. 2007. gadā ievāktajiem ābeļu un bumbieru lapu paraugiem, kopējās genomiskās RNS ekstrakcijai izmantoja komerciāli pieejamu RNeasy Plant Mini Kit reaģentu komplektu (Qiagen, Vācija). RNS izdalīta vadoties pēc ražotāja instrukcijām. Ābeļu lapu audu lizēšanai izmantoja RLT buferi, bet bumbieru lapu audiem RLC buferi. Kopējās genomiskās RNS/DNS ekstrakcijai no 2008. gada līdz 2021. gadam ievāktajiem lapu paraugiem izmantoja komerciāli pieejamu Genomic DNA Purification Kit izdalīšanas komplektu (Thermo Fisher Scientific, Lietuva). Nukleīnskābju izdalīšana veikta vadoties pēc ražotāja ieteikumiem, veicot nelielas izmaiņas izdalīšanas protokolā. Aptuveni 100 mg sasmalcināts lapu paraugs suspendēts 200 µl TE buferšķīdumā, kas bija sajaukts ar 0.8 µl 99% 2-merkaptotetanolā (Roth, Vācija). Pirmo centrifugēšanas soli veica pie maksimālā ātruma (~14000 apgr./min). Nukleīnskābju izgulsnēšanu veica ar ledusaukstu 96% etanolu un atstāja uz nakti -20 °C temperatūrā, nevis 10 minūtes, kā norādīts ražotāja protokolā. Lai iegūtu RNS bez DNS piejaukuma, pēc ekstrakcijas suspensijai pievienota DNāze I (Thermo Fisher Scientific, Lietuva). Izdalītās RNS kvalitāti un kvantitāti novērtēja ar spektrofotometru NanoDropR ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, ASV). Izdalīto RNS uzreiz tālāk izmantoja RT-PCR veikšanai vai uzglabāja -80 °C temperatūrā.

Kā apstiprinošo diagnostikas metodi izmantoja RT-PCR un *One-Step RT-PCR* reaģentu komplektu (Qiagen, Vācija), pēc Hassan et al., 2006 izstrādātā protokola. Vīrusu diagnostikai augos izmantoja vīrusa genomam specifiskus oligonukleotīdus (Menzel et al., 2002; Hassan et al., 2006). Vīrusu diagnostikā pielietotās oligonukleotīdu sekvences ir parādītas 2.2. tabulā. Kā pozitīvo kontroli testa veikšanai izmantoja DAS-ELISA testa pozitīvos paraugus. RNāzes nesaturošu ūdeni un augu *nad5* gēnu amplificējošos oligonukleotīdus pielietoja reakcijas kvalitātes kontrolei.

Visus RT-PCR soļus veica *Eppendorf Mastercycler* termociklerā (Eppendorf AG). RT-PCR galaproduktus noteica elektroforēzē 2% agarozes gēlā, TAE buferī, krāsojot ar etīdija bromīdu un vizualizējot UV gaismā. RT-PCR produktu garumu noteica, salīdzinot ar *O'RangeRuler* 100bp DNS garuma fragmenta marķieri (Thermo Fisher Scientific, Lietuva).



**RT-PCR izmantotie oligonukleotīdi vīrusu noteikšanai/ The oligonucleotide primers used in RT-PCR for the detection of viruses**

Nosakāmais organisms/ <i>Target organism</i>	Oligonukleotīdu sekvences/ <i>Primers</i> (5' – 3')	Fragmenta garums/ <i>Fragment length</i> (bp)
ACLSV	F – TTCATGGAAAGACAGGGGCAA R – AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAAGTCTAA	667
ApMV	F – CGTAGAGGAGGACAGCTTGG R – CCGGTGGTAACTCACTCGTT	450
ASGV	F – GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAA R – AACCCCTTTTTGTCCTTCAGTACGAA	273
ASPV	F – ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA R – TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA	370
<i>nad5</i>	F – GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT R – CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA	181

**2.3.3. Vīrusu pārbaude ar kokveida indikatoraugiem**

2010. gadā no Nīderlandes Dārzkopības inspekcijas dienesta (Naktuinbouw) ieguva 17 vīrusbrīvus kokveida indikatoraugu genotipus, kurus uzacoja uz viengadīgiem sēklaudžu potcelmiem un uzturēja siltumnīcas apstākļos. Lai pārbaudītu termoterapijas efektivitāti, 2012. gadā veica pirmo pārbaudi uz vīrusu klātbūtni šķirnēm: ‘Ausma’, ‘Baltais Dzidrais’, ‘Spartan’, ‘Liberty’, ‘Lobo’, ‘Antej’, ‘Melba’, ‘Lobo’ un ‘Antonovka’ (V publikācija). Pārbaudāmo (atveseļoto) materiālu un indikatoraugus uzacoja uz ābeļu šķirnes ‘Antonovka’ sēklaudžu potcelmiem. Acošanu veica veģetācijas periodā, ievietojot snaudošo pumpuru zem potcelma mizas, pēc Kirby et al. (2001) aprakstītās metodikas, trijos atkārtojumos. Darbā izmantoja kokveida indikatoraugus *Malus platycarpa* (ACLSV noteikšanai), *M. pumila* ‘Virginia Crab’ (ASGV un ASPV noteikšanai), *M. pumila* ‘Lord Lambourne’ (ApMV noteikšanai). Uz sēklaudžu potcelmiem uzpotētos indikatoraugus izmantoja kā negatīvo kontroli. Ābeļu šķirni ‘Rubin’, kurai iepriekš ar RT-PCR apstiprināja četrus vīrusu infekciju, izmantoja kā pozitīvo kontroli. Pēc acošanas augus uzturēja insektu necaurļaidīgā siltumnīcā ar dzesēšanu. Lai nodrošinātu optimālu temperatūru simptomu izpaušmei, uzturētās temperatūras diapazons bija 18 – 25 °C. Uzacotos augus novēroja astoņas nedēļas, līdz parādījās simptomi. Simptomu pazīmes novērtētas arī nākamās veģetācijas sezonas sākumā.

## 2.4. Ģenētiskās analīzes

### 2.4.1. Sekvencēšana un sekvenču analīze

No 2008. līdz 2021. gadam no ģenētisko resursu kolekcijām un savvaļās ievāktos ACLSV pozitīvos paraugus atkārtoti testēja ar otru oligonukleotīdu pāri (CP1/CP2), kas amplificē 803 nukleotīdus garu vīrusa proteīna apvalku kodējošo genoma fragmentu (CP1 5' CAAGAGARTTTCAGTTTGCTCG 3'/ CP2 5' AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA 3') (III publikācija). No ACLSV inficētajiem augiem izdalīto RNS sekojoši transkribēja uz cDNS. Klonālās DNS sintēzei izmantoja *High Capacity cDNA Reverse Transcription* reaģentu komplektu (Applied Biosystems, ASV) ar randomizētiem heksamēra oligonukleotīdiem, saskaņā ar ražotāja protokolu. Vīrusa apvalka proteīna kodējošo sekvenču amplifikācijai izmantoja *REDTaq® ReadyMix™* PCR reakcijas maisījumu (Sigma-Aldrich, Vācija) ar CP specifisko oligonukleotīdu pāri (CP1/CP2), saskaņā ar ražotāja norādījumiem.

PCR produktus attīrīja, izmantojot reaģentu komplektu *GeneJet PCR Purification kit* (Thermo Fisher Scientific, Lietuva), un sekvencēja abos virzienos, izmantojot tos pašus PCR amplifikācijas oligonukleotīdus. Sekvencēšanu veica ar *3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, ASV) automatizēto ģenētisko analizatoru Latvijas Valsts mežzinātnes institūtā "Silava". Kopumā sekvencētas 34 pilna garuma ACLSV CP kodējošās sekvenses, kas iegūtas no dažādiem genotipiem un ievākšanas vietām.

Sekvenču montāžu, kvalitātes pārbaudi un izlīdzinājumus (*alignment*) veica, izmantojot datorprogrammu pakotni *LASERGENE 17* (DNASTAR Inc., ASV). Katra izolāta pilna garuma amplikona sekvenci (*contig*) samontēja no tiešās un reversās sekvenses lasījuma un manuāli rediģēja programmā *SeqMan Pro 17*. Lai nodrošinātu kvalitāti, sekvenču galus noīsināja un pielīdzināja. Lai noteiktu iespējamās atvērtā lasīšanas rāmja (ORF) nobīdes kļūdas (stop kodoni), iegūtās nukleīnskābju sekvenses izlīdzinājumus pārtranslēja aminoskābju sekvensēs. Iegūtās sekvenses deponēja GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) un tās ir publiski pieejamas ar numuriem ON641843 – ON641876.

Šajā pētījumā iegūtās 29 ACLSV CP gēna (ORF3) sekvenses no ābelēm un bumbierēm un piecas no plūmēm salīdzināja ar 282 ACLSV CP sekvensēm no *Malus*, *Cydonia*, *Crataegus* un *Pyrus* ģints augiem un 90 sekvensēm no *Prunus* ģints augiem, kas pieejamas GenBank datu bāzē ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Darbā analizēja ACLSV genoma reģionu no 6784 līdz 7365 nt (saskaņā ar references sekvenci NC\_001409 no GenBank). Sekvenču izlīdzināšanu veica, izmantojot MAFFT algoritmu, un nukleīnskābju un aminoskābju sekvenču savstarpējo identitāti noteica ar MegAlign Pro programmu LASERGENE v. 17.

## 2.4.2. Rekombināciju noteikšana un filoģenētiskās analīzes

Rekombināciju analīze veikta, izmantojot rekombinācijas noteikšanas programmu RDP v. 5 (Martin et al., 2021), lai izslēgtu, ka iegūtās vīrusa sekvences ir rekombinanti, ar atšķirīgu filoģenētisko izcelsmi, kas veidojušies starp atšķirīgiem ACLSV genotipiem vai cita vīrusa RNS, kas atrodas vienā augā, un vai arī ar auga RNS. Analīzes veica 34 šajā pētījumā iegūtajām sekvencēm un 372 ACLSV CP gēnu sekvencēm, kas iegūtas no *Malus*, *Cydonia*, *Crataegus*, *Pyrus* un *Prunus* ģints saimniekaugiem, un ir pieejamas GenBank datubāzē (III publikācija). Analīzes veica, izmantojot noklusējuma iestatījumus, iekļaujot septiņas metodes: *RDP*, *GENECONV*, *Chimaera*, *MaxChi*, *BootScan*, *SiScan* un *3Seq*. Par nozīmīgiem uzskatīja tikai tos rekombinācijas notikumus, kurus apstiprināja vismaz ar trijām no RDP5 iekļautajām metodēm ar  $p \leq 0,05$ . Identificētās iespējamās rekombinantās sekvences izslēdza no tālākām filoģenētiskajām analīzēm.

Sekvenču datu izlīdzinājumus vīrusa izolātiem no sēkleņkokiem un kaulēnkokiem veica atsevišķi. Vīrusa sekvenču izlīdzinājuma pirmajā datu kopā ietvēra 27 šajā pētījumā iegūtās sekvences un 276 ACLSV CP nukleotīdu sekvences no sēkleņkoku izolātiem, kas bija pieejamas GenBank, savukārt otrajā sekvenču datu kopā analizēja piecas šajā pētījumā iegūtās sekvences no kaulēnkoku izolātiem un 90 homologās sekvences no GenBank. Aprikožu pseidohlorotiskās lapu plankumainības vīrusa (APCLSV) CP kodējošās sekvences: AY713380, JN873309, KX768275 un KY310579 iekļāva kā kontroles grupu gan sekvenču izlīdzināšanā, gan filoģenētiskajās analīzēs. Lai rekonstruētu filoģenētiskās sakarības starp ACLSV izolātiem, pielietoja *Maximum parsimony* analīzi datorprogrammā PAUP (Swofford, 2002) v.4.0a169 (<http://phylosolutions.com/paup-test/>). Izlīdzinājumus pakļāva heuristikajai (*heuristic*) meklēšanai ar nejaušas pievienošanas secību, 1000 atkārtojumos ar šādiem programmas iestatījumiem: *MulTrees* opcija nav spēkā, *Steepest descent* metode ir spēkā un veikta koka sadalīšanas atkārtota savienošana (*tree bisection reconnection* (TBR)). Tos pašus iestatījumus izmantoja statistiskā atbalsta (*bootstrap*) analīzēs ar trim nejaušām pievienošanas sekvencēm katrā no 1000 (*bootstrap*) atkārtojumiem.

## 2.5. Datu statistiskā analīze

### 2.5.1. Aprakstošā statistika

DAS-ELISA testa un RT-PCR sākotnējiem datiem veica aprakstošo statistiku ar Excel pamatprogrammu. ACLSV sastopamību izteica procentuāli kā inficēto paraugu īpatsvaru no testēto paraugu skaita. Būtiskuma līmeņa noteikšanai starp konstatēto pozitīvo un negatīvo gadījumu skaitu šķirņu paraugos aprēķināja:

vidējā vērtība ( $\mu$ )  $\pm$  standartnovirze ( $\sigma$ ). Vīrusa sastopamības dati analizēti ar Fišera precīzo testu datorprogrammā GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., ASV), lai noteiktu būtiskuma līmeni starp divām kategoriju vērtībām (pie  $p \leq 0.05$ ), piemēram, sēkklaužu un klona potcelmi.

## 2.5.2. Koku augšanas un ražas parametru apstrāde

Apkopotos datus – koka stumbra diametru (20 cm virs potēšanas vietas), vainaga parametrus, ražu no koka un augļu lielumu izmantoja, lai aprēķinātu produktivitāti, stumbra šķērsriezuma laukumu (TCSA) un kumulatīvās ražas efektivitāti (kumulatīvā raža uz TCSA un vainaga tilpuma attiecību) (IV publikācija). Vainaga tilpums aprēķināts atbilstoši I. Dimzas piedāvātajai formulai (Rubauskis et al., 2012).

$$V = 0.5235 \cdot d_1 \cdot d_2 \cdot (H_1 - H_0) \cdot \left(\frac{f_1 + f_2}{2}\right)^{3/2} \quad (1)$$

V – vainaga tilpums/ *canopy volume*, m<sup>3</sup>;

d<sub>1</sub> un d<sub>2</sub> – vainaga diametrs divos perpendikulāros virzienos – rindā un pāri rindai/ *canopy diameter in two perpendicular directions – in the row and across the row*, m;

H<sub>0</sub> – attālums no augsnes virsmas līdz lapotnes zemākajam punktam/ *distance from the soil surface up to the lowest point of the canopy*, m;

H<sub>1</sub> – koka augstums – attālums no augsnes virsmas līdz koka galotnei/ *tree height – distance from the soil surface to the top of the tree*, m;

f<sub>1</sub> un f<sub>2</sub> – figuralitātes koeficients, kas raksturo vainaga blīvumu/ *figural coefficients, which characterize the density of the canopy*.

Datus apstrādāja, izmantojot programmatūru SPSS Statistics 25. Dati analizēti ar dispersijas analīzi (ANOVA). Statistisko nozīmīgumu aprēķināja pamata faktora (šķirnes), blakusfaktora (vīrusa) ietekmei un abu faktoru mijiedarbībai. Atšķirību starp mainīgajiem uzskatīja par nozīmīgu pie  $p \leq 0.05$ .

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

### 3.1. ACLSV sastopamība augļu dārzos un savvaļā

Iegūtie rezultāti parādīja, ka ACLSV ir plaši sastopams ābeļu un bumbieru dārzos, un lielākā daļa Latvijā audzēto ābeļu un bumbieru šķirņu, kā arī atsevišķas plūmju šķirnes ir inficētas ar to (I un II publikācijas). Arī iepriekš veiktie pētījumi Latvijā (Švarcbahs & Miltiņš, 1982), izmantojot kokaugu indikatoraugus, parādīja, ka daudzas ābeļu un bumbieru šķirnes ir inficētas ar latentajiem vīrusiem. ACLSV konstatēja visos pārbaudītajos ābeļdārzos, 27 no 36 bumbieru dārzos un sešos no 28 plūmju dārzos. Ievērojami lielāku vīrusa sastopamību ābeļdārzos konstatēja Kurzemē nekā pārējos vēsturiskajos novados (3.1. tabula). Pielietojot DAS-ELISA, ACLSV atklāja tikai 11.4% testētajiem ābeļu paraugiem, 4.8% bumbieru un 2.6% plūmju paraugiem, savukārt ar RT-PCR ACLSV konstatēja 65.4% ābeļu paraugiem, 32.3% bumbieru un 2.0% plūmju paraugiem. ACLSV izplatība Latvijā ir līdzīga citu valstu datiem, kur tā sasniedz 33% līdz 100%, ja augļu dārzu ierīkošanai neizmanto vīrusbrīvu stādmateriālu (Desvignes 1999; Krizbai et al., 2001; Kundu 2003; Kukharchyk 2006). Ar RT-PCR konstatēja ievērojami augstāku pozitīvo gadījumu skaitu nekā ar DAS-ELISA, bet ne visus ar DAS-ELISA noteiktos pozitīvos paraugus varēja apstiprināt arī ar RT-PCR.

3.1. tabula/ Table 3.1.

**Ābeļu hlortiskās lapu plankumainības vīrusa sastopamība vēsturiskajos novados Latvijā 2007. un 2008. gadā, diagnostiku veicot ar RT-PCR/  
Occurrence of apple chlorotic leaf spot virus in Latvian historical regions in 2007 and 2008, as tested by RT-PCR**

Vēsturiskie novadi/ <i>Historical regions</i>	Inficēto paraugu īpatsvars/ <i>Number of infected samples, %</i>		
	Ābeles/ <i>Apples</i>	Bumbieres/ <i>Pears</i>	Plūmes/ <i>Plums</i>
Kurzeme	80.0*	41.7	2.0
Latgale <sup>1</sup>	50.0	28.3	1.5
Vidzeme	64.1	24.6	1.4
Zemgale <sup>1</sup>	66.6	34.4	3.4

\* Norāda statistiski būtiski augstāku ACLSV sastopamību konkrētā vēsturiskajā novadā ( $p \leq 0.05$ )/  
*Indicates significant difference among the occurrence of ACLSV in historical regions by Fisher's exact test ( $p \leq 0.05$ ).*

<sup>1</sup> Nelielā skaita dēļ, aprēķinos augļu dārzi, kas atradās Sēlijā, iekļauti Zemgales vai Latgales vēsturiskajos novados/  
*The orchards located in Sēlija are included in the historical regions of Zemgale or Latgale in the calculations, due to the small number of samples.*

Vīrusu noteikšanas metodes var būtiski ietekmēt rezultātus, tām ir atšķirīgs jutīgums un precizitāte. Kokaugu indikatoraugu izmantošana ir strīdīga, jo īpaši, kad rezultātus ir grūti interpretēt simptomu neesamības dēļ (Menzel et al., 2002). DAS-ELISA jutīgumu var ietekmēt zema vīrusu koncentrācija augos noteiktā augšanas sezonas periodā (vasara, rudens). *Trichovirus* ģints vīrusu koncentrācija augos svārstās augšanas sezonas laikā un samazinās vasaras laikā, paaugstinoties vides temperatūrai (Fuchs et al., 1985). DAS-ELISA metode tiek uzskatīta par ticamu, ja paraugiem izmanto jaunas un simptomātiskas lapas (Torrance & Dolby 1984; Desvignes 1999). Diagnostikas metodes, kas pamatojas uz nukleīnskābju analīzi, plaši izmanto un uzskata par ticamu vīrusu noteikšanai (Kirby et al. 2001). Šī darba laikā atklāto pozitīvo paraugu skaits bija ievērojami augstāks, izmantojot RT-PCR, nekā DAS-ELISA, lai gan RT-PCR neapstiprināja visus pozitīvos ELISA rezultātus. Tas parāda ka neviena no pielietotajām diagnostikas metodēm nav absolūti ticama. Kā norādīja MacKenzie et al. (1997), neskatoties uz augsto jutību un specifiskumu, RT-PCR ietekmē daudzi faktori, piemēram, RNS tīrība un diagnostikā izmantoto oligonukleotīdu specifika, kas var ietekmēt diagnostikas testa veiktspēju un var sniegt kļūdaini negatīvus rezultātus. Turpretim plaša spektra poliklonālās antivielas aptver plašāku vīrusa ģenētiskās daudzveidību spektru, tāpēc joprojām vairāku metožu kombinācija ir vēlama precīzai un specifiskai vīrusa noteikšanai.

Visi pārbaudītie ābeļu šķirnes 'Stars' paraugi bija inficēti ar ACLSV, un arī pozitīvo gadījumu skaits vairākām ābeļu šķirnēm bija ievērojami virs vidējā līmeņa. Turpretim tikai atsevišķām bumbieru ('Bere Kijevskaja' un 'Duhmjanaja') un plūmjū ('Prune d'Agen' un 'Experimentalfältets Sviskon') šķirnēm ACLSV sastopamība ievērojami pārsniedza vidējo līmeni, savukārt visi pārbaudītie paraugi no *Prunus cerasifera* sējeņiem uzrādīja negatīvu rezultātu ar abām pielietotajām metodēm.

Analizējot ACLSV sastopamību ābeļu un bumbieru stādījumos atkarībā no potcelma veida (sēklaudzis vai klona potcelms), uz klona potcelmiem acotās ābeļu šķirnes uzrādīja būtiski ( $p = 0.014$ ) augstāku ACLSV sastopamību nekā uz sēklaudžu potcelmiem acotās šķirnes (3.2. tabula).

**Ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīrusa sastopamība augļu kokos atkarībā no potcelma veida, diagnostiku veicot ar RT-PCR/  
The occurrence of apple chlorotic leaf spot virus in fruit trees depending on rootstock type, as detected by RT-PCR**

Saimniekaugs/ Host	Potcelma veids/ Type of the rootstock	Analizēto paraugu skaits/ Number of samples	Inficēto paraugu īpatsvars/ Number of infected samples, %
<i>Malus domestica</i>	Sēklaudži/ Seedlings	60	51.7
	Klona/ Clonal	239	69.5*
<i>Pyrus communis</i>	Sēklaudži/ Seedlings	71	29.6
	Klona/ Clonal	7	14.3

\*Norāda būtisku atšķirību ACLSV sastopamībā starp potcelmu tipiem pēc Fišera precīzā testa ( $p < 0.05$ )/ Indicates a significant difference in ACLSV occurrence between rootstock types by Fisher's exact test ( $p < 0.05$ )

Augstā vīrusa sastopamība ābeļdārzos ir saistīta ar klona potcelmu ietekmi, ko apstiprināja datu statistiskā analīze. Arī daudzas vietējās un dažas no kaimiņvalstīm introducētās ābeļu šķirnes ir inficētas ar ACLSV. Vīrusu izplatību augļu dārzos veicinājusi sākotnēja inficēta pavairojamā materiāla izmantošana no ģenētisko resursu kolekcijām. Līdzīgi iepriekšējie pētījumi ir parādījuši, ka Malling un Merton sērijas klona potcelmi bija inficēti ar ACLSV (Šutić et al. 1999). Arī Švarcbahs un Miltiņš, 1982. gadā ziņoja, ka Latvijā 61% klona potcelmu ir inficēti ar latento vīrusu kompleksu. Iegūtie dati apstiprināja iepriekšējo ziņojumu (Švarcbahs un Miltiņš, 1982), ka daudzas vietējās ābeļu šķirnes un introducētās šķirnes, kuras joprojām ir plaši audzētas, ir inficētas ar ACLSV. Latvijā bumbieres galvenokārt audzē uz ‘Kazrašu bumbieres’ sēklaudžu potcelmiem un vīrusu sastopamība bumbierēs, salīdzinot ar ābelēm, bija daudz zemāka. Līdz šim uzskatīja, ka vīruss nevar izplatīties ar sēklām (Brunt et al. 1996), tāpēc iespēja, ka bumbieru sēklaudžu potcelmi varētu būt iespējama infekcijas avots ir maz ticama, bet nav pilnībā izslēdzama. Atsevišķi pētījumi rāda, ka ACLSV ir sastopams sēklās (Li et al., 2022) un dabā iespējams pastāv arī vīrusa vektori (Šutić et al., 1999). Lielākā daļa bumbieru šķirņu ir ievestas Latvijā no kaimiņvalstīm, piemēram, Baltkrievijas, Lietuvas, Ukrainas, Krievijas un Igaunijas, kur stādāmā materiāla sertifikācijas sistēma vēl nav izveidota; tādējādi inficētie potzari ir visticamākais sākotnējās infekcijas avots. Salīdzinot ar ābelēm un bumbierēm, ACLSV sastopamība plūmju stādījumos bija zema, tomēr dažas plūmju šķirnes uzrādīja lielāku šī vīrusa pozitīvo gadījumu skaitu nekā citas, piemēram, Zviedrijas izcelsmes šķirne

‘Experimentalfältets Sviskon’ un šķirne ‘Prune d’Agen’. Tas liecina, ka materiāla sākotnējais avots, iespējams, jau bija inficēts, un ACLSV tālāk izplatīts, izmantojot šo inficēto pavairošanas materiālu.

Testējot paraugus, kurus ievāca no ģenētisko resursu kolekcijām un no savvaļā augošajiem Rosaceae augiem (III publikācija), ACLSV konstatēja 79 *Malus*, *Prunus* un *Pyrus* ģints augu paraugiem. No pētījumā iekļautajām auglaugu ģintīm, 81% ACLSV pozitīvo paraugu bija no *Malus* ģints augiem. ACLSV nekonstatēja aprikozēm un savvaļā augošajiem *Amelanchier*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Prunus* un *Sorbus* augiem. Vīrusu konstatēja tikai kultivētajām ābelēm, bumbierēm, plūmēm un arī savvaļā augošajiem *Malus* ģints augiem, tostarp *M. sylvestris*. Šī ir pirmā reize, kad savvaļā augošajiem *M. sylvestris* augiem ir konstatēta ACLSV infekcija. Lai gan daudzas kreba ābeļu sugas tiek uzskatītas par ļoti ieņēmīgām (Mink, 1989), iepriekš ACLSV infekcija laboratoriski apstiprināta tikai *M. spectabilis* (Chen et al., 2014). Eksperimentāli ar vīrusu inokulētas vairākas *Malus* sugas un hibrīdi (Campbell, 1962), bet tos nevar uzskatīt par dabīgiem saimniekaugiem.

### 3.2. Rekombināciju analīze ACLSV CP gēnā

ACLSV CP gēna sekvenču rekombināciju analīzi veica 34 šajā pētījumā iegūtajiem vīrusa izolātiem kopā ar 372 analogām sekvencēm no GenBank (III publikācija). Veiktās analīzes atklāja astoņus iespējamus rekombinācijas notikumus. Lielākā daļa rekombināciju notikumu identificēti CP gēna sākuma daļā. Rekombināciju lūzuma punktus (*breakpoint*) sešiem konstatētajiem rekombināciju gadījumiem nevarēja pārliecināti noteikt, iespējams, tie varētu būt lokalizēti pārvietošanās proteīna (*moving protein*, MP) kodējošajā genoma daļā vai genoma nekodējošajā reģionā (3' UTR).

Rekombināciju veicinošie faktori var būt atšķirīgu vīrusa genotipu vai vairāku vīrusu infekcija augā un augsts vīrusu replikācijas potenciāls (Astier et al., 2007). Ir zināms, ka ACLSV genoma daļa, kurā MP pārklājas ar CP gēnu ir ļoti variabla (Myrta et al., 2011), un rekombināciju notikumi šajā genoma daļā ir identificēti arī iepriekšējos pētījumos (Rana et al., 2010; Chen et al., 2014; Mažeikiene et al., 2018), kas var ietekmēt vīrusa ģenētisko daudzveidību. Visi iespējamie rekombinācijas notikumi atpazīti vismaz ar trim noteikšanas metodēm, kas iekļautas RDP5 programmu pakotnē. Kā rekombinantu vecāku sekvenses atpazītas no tā paša saimniekauga radniecīgiem izolātiem, izņemot sekvencēm KC404877 un KC404872, kur kā viena no vecāku sekvencēm noteikta no bumbieru izolāta, un ābeļu izolātam LV27 kā vecāku sekvenses identificētas no bumbieru un persiku izolātiem. Šajā pētījumā iegūtajiem ACLSV izolātiem visi rekombināciju notikumi CP gēna sekvencēs identificēti kultivētajām ābelēm un arī savvaļā augošajai ābelei (izolāts NZ5), kas apstiprina, ka rekombināciju process ir izplatīts ACLSV populācijā. Ģenētiskās izmaiņas vīrusu populācijās noris nepārtraukti. Galvenie ģenētisko variāciju avoti ir



mutācijas un rekombinācijas. Lielākā daļa ģenētiskās variācijas var būt letālas vai neitrālas, bet dažos gadījumos tās var būt noderīgas konkrētā vidē (Lemey & Posada, 2009). Sekvenču salīdzināšana, sekvenču līdzības noteikšana un filoģenētisko koku konstruēšana ļauj noteikt gan radniecību starp vīrusu taksoniem un izolātiem, gan veikt populācijas ģenētiskās daudzveidības analīzi (Choudhuri, 2014). Šī informācija savukārt ļauj noteikt vīrusu izcelsmi un potenciālos izplatīšanās ceļus un sniedz nozīmīgu informāciju par vīrusa epidemioloģiju.

### 3.3. ACLSV ģenētiskā daudzveidība

ACLSV genoma ORF3 reģiona kodējošo CP sekvenču salīdzināšana veikta 34 ACLSV *Malus*, *Pyrus* un *Prunus* ģints augu izolātiem pozīcijā 6784 – 7365 nt (saskaņā ar ACLSV references sekvenci NC\_001409). Analizēto sekvenču identitātes svārstījās no 79.55% līdz 98.45% nt līmenī un 84.54% līdz 100% aa līmenī starp šajā pētījumā iegūtajiem ACLSV izolātiem un no 66.49% līdz 99.14% nt līmenī un no 68.04% līdz 100% aa līmenī, salīdzinot ar GenBank pieejamām 374 homologajām ACLSV sekvencēm. Latvijas ACLSV izolātu CP gēnu sekvenču identitāti (79.55% līdz 98.45% nt līmenī un 84.54% līdz 100% aa līmenī) varētu uzskatīt par variablu, taču tā nepārsniedz paredzētos sugu demarkācijas kritērijus *Betaflexiviridae* dzimtā – 72% nt identitāte vai 80% aa identitāte starp attiecīgajām CP gēnu sekvencēm (Kreuze et al., 2011). Tomēr dažiem šajā pētījumā iegūtajiem ābeļu un bumbieru izolātiem, bija 100% identitāte aminoskābju līmenī ar citām GenBank sekvencēm, kas norāda uz stādāmā materiāla nozīmīgo lomu ACLSV izplatībā, īpaši lielos attālumos (Mink, 1989). Ābeļu izolāts LV54 uzrādīja visaugstāko identitāti nt līmenī (99.14%) ar izolātu no Brazīlijas (KX668485) un 100% identitāti aa līmenī ar citu šajā pētījumā iegūto ābeļu izolātu LV44 un ar 22 citiem ābeļu izolātiem no GenBank (no Brazīlijas, Ķīnas, Kanādas, Etiopijas, Irānas un Lietuvas). Bumbieru izolātam LV81 konstatēja 100% identitāti aa līmenī ar diviem ābeļu izolātiem no Vācijas (KX579123) un Ķīnas (MH534897). Zemāko identitāti nt līmenī (66.49%) konstatēja ābeļu izolātam LV07 ar persiku izolātu no Ķīnas (JN849004), savukārt viszemākā identitāte (68.04%) aa līmenī konstatēta starp diviem persiku izolātiem no Ķīnas (JN849007) un Kanādas (MZ126485). Lai analizētu ACLSV ģenētisko daudzveidību, visas sekvences, ieskaitot izolātus no Latvijas un citām pasaules daļām, sadalīja deviņās grupās pēc to saimniekaugiem (III publikācija). ACLSV izolāti no aprikozēm (94.5% nt un 98.97% aa sekvenču identitāte) veidoja viendabīgu grupu. Vislielākā ACLSV apvalka proteīna gēna sekvenču variabilitāte novērota persiku izolātiem, kuriem konstatēja 68.04% – 100% identitāti nt līmenī un 71.13% – 100% identitāte aa līmenī. Viszemākā identitāte novērota starp ābeļu un persiku izolātu grupām, kurām bija 66.49% – 100% identitāte nt līmenī un 68.04% – 100% aa līmenī. Tā kā vīruss viegli izplatās veģetatīvās pavairošanas ceļā – ar sakņu spraudņiem, acošanu un

potēšanu (Šutić et al., 1999), jaunizveidotie augi var uzkrāt vairākus vīrusa ģenētiskos variantus, un vienā ābeļu paraugā var atrasties pat četri atšķirīgi vīrusa genotipi (Chen et al., 2014), kas var veicināt atšķirīgu ģenētisko variantu veidošanos.

Esošā augstā variabilitāte starp dažādiem kokaugu grupu izolātiem un tajā pašā laikā identisku nukleotīdu secību esamība starp dažādu ģinšu augu izolātiem, kas iegūti no savvaļas vai kultivētiem augiem, norāda uz neskaidrībām par vīrusa pārnesšanas ceļiem starp dažādām augu grupām (piem., *Malus* un *Prunus*), jo parasti lauksaimniecības praksē veģetatīvā pavairošana starp šīm augu grupām nenotiek. Ir konstatēta ACLSV dabiska izplatīšanās lauka apstākļos, taču eksperimentāli nav apstiprināts neviens no pētītajiem potenciālajiem vīrusa vektoriem: *Eudosylaimoid* ģints nematodes, persiku laputis (*Myzus persicae*) vai ziedputekšņi (Mink, 1993; Šutić, 1999). Nesen Li et al. (2022) identificēja ACLSV klātbūtni inficētu *Pyrus Betulifolia* un *P. calleryana* augļu sēklās un sēklaudžos, pierādot, ka vīruss var izplatīties arī ar sēklām. Arī iepriekš ACLSV konstatēts ābeļu un cidoniju sēklaudžos (Posnette & Cropley, 1964), gan arī dzīvžogos audzētajās vilkābeļu un dzeloņplūmju sēklaudžos Apvienotajā Karalistē (Sweet, 1980). Mazeikiene et al. (2018) ziņoja, ka ACLSV ir sastopams arī vecās sēklaudžu ābelēs. Šajā pētījumā ACLSV konstatēts kultivēto ābeļu sēklaudžiem un arī savvaļā augošajiem *M. sylvestris* kokiem, kas norāda iespējamo vīrusa pārnesšanu ar sēklām. Atsevišķus *Trichovirus* ģints vīrusus pārnes ērces, piemēram, ķiršu raiblapainības vīrusu (CMLV) pārnes ērcu suga *Eriophyes inaequalis* un persiku mozaīkas vīrusu (PcMV) izplata *Eriophyes insidiosus* (Kreuze et al., 2011). Vairākas *Eriophyes* ģints ērcu sugas kolonizē arī ābeles, bumbieres un plūmes. Lielākā daļa šo ērcu ir monofāgi, izņemot *Eriophyes pyri*, kas ir poligofāga un dzīvo *Malinae* augos, sūkļveida parenhīmā (Skoracka et al., 2005). Lai gan *Eriophyes* ģints ērcu loma ACLSV transmisijā ir vēl eksperimentāli jāpierāda, jo, vai vispār pastāv kāds ACLSV bezmugurkaulnieka vektors, joprojām tiek apšaubīts.

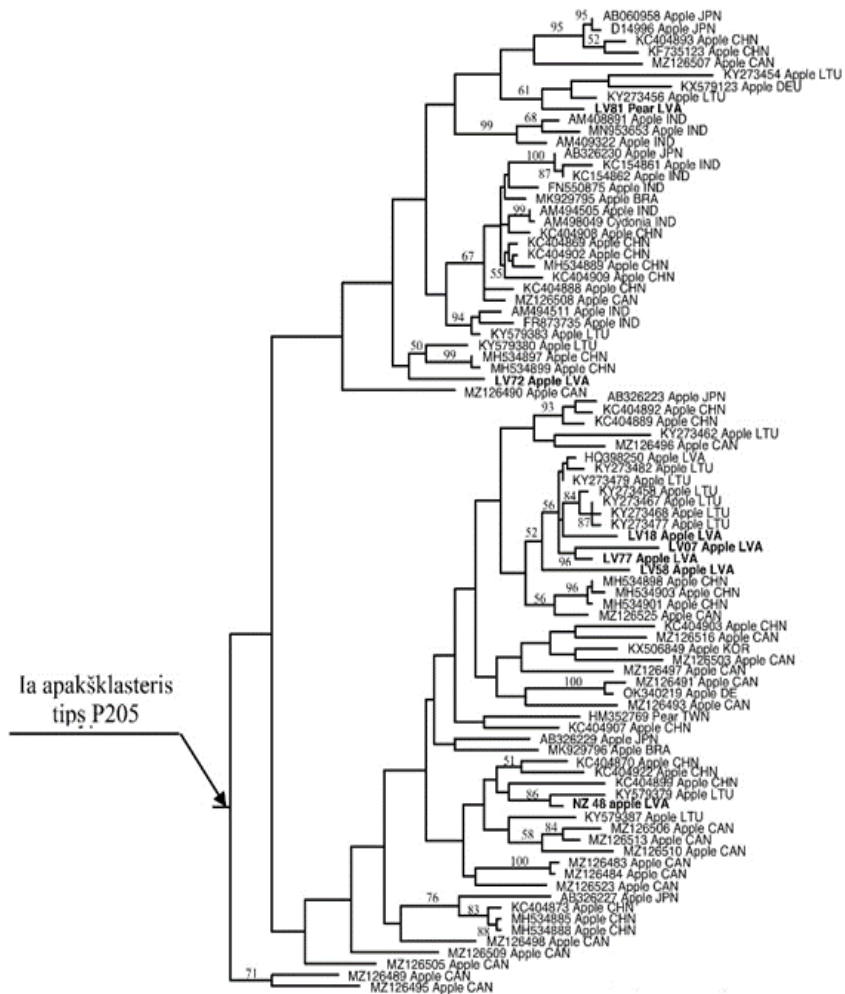
### 3.4. ACLSV filoģenēze un ģenētiskie tipi

Vīrusa apvalka proteīnu kodējošās CP gēna sekvenses (nt 6781 – 7362) izmantoja, lai noskaidrotu ģenētisko radniecību starp ACLSV izolātiem, kas izdalīti no dažādiem saimniekaugiem un ģeogrāfiskajiem reģioniem (III publikācija). Ābeļu apakštribas (*Malinae*) augu ACLSV izolātu analīzēs iekļāva 303 vīrusu izolātus no dažādām *Malus*, *Crataegus*, *Cydonia* un *Pyrus* sugām. ACLSV sekvenses sadalījās divos lielos klasteros (I un II klasteris). Pirmo galveno klasteri veidoja divi apakšklasteri (apakšklasteris IA un IB), kuros ACLSV sekvenču grupēšanās nebija saistīta ar to ģeogrāfisko izcelsmi vai saimniekaugiem. Aminoskābju sekvenču analīze parādīja, ka IA apakšklasteris atšķiras no IB apakšklastera un II klastera septiņās pozīcijās. IA apakšklasterim ir aminoskābju kovariācijas: Ala<sup>40</sup> -Val<sup>59</sup>-Phe<sup>75</sup>-Ile<sup>86</sup>-Ser<sup>130</sup>-Gly<sup>137</sup>-Met<sup>184</sup>,

savukārt apakšklasterim IB aminoskābju kovariācijas: Ser<sup>40</sup>-Leu<sup>59</sup>-Tyr<sup>75</sup>-Ala<sup>86</sup>-Thr<sup>130</sup>-Ser<sup>137</sup>-Leu<sup>184</sup>. Turklāt II klasteris atšķiras no abiem apakšklasteriem IA un IB divās aminoskābju pozīcijās: 73 un 79, ar Ser, Gly vietā (III publikācija). Visi Latvijas izolāti bija vienmērīgi sadalīti abos IA un IB apakšklasteros. IA apakšklasteris sastāvēja no divām daļām (IA1 un IA2) un ietvēra piecus Latvijas ACLSV izolātus no kultivētiem ābelēm (*Malus domestica*) un vienu izolātu no savvaļas *M. sylvestris* (NZ48), kā arī vienu izolātu no kultivētām bumbierēm (LV81) kopā ar tipa izolātu P205 (D14996) no Japānas un 79 citām sekvencēm no kultivētajām ābelēm, kas iegūtas no GenBank (3.1.att.).

Apakšklasteris IB ietvēra četrus Latvijas ACLSV izolātus no kultivētajām bumbierēm, tostarp izolātu no Ukrainas, kas iegūts šajā pētījumā un 16 izolātus, kas iegūti no kultivētajām un savvaļas ābelēm kopā ar B6 tipa izolātu (AB326224) no Japānas un 151 citām sekvencēm no kultivētajiem sēkleņkokiem, kas iegūti no GenBank datu bāzes (3.2. att.).

Septiņpadsmit izolāti no *P. pyrifolia* (GU327984 – GU328004) veidoja atsevišķu grupu apakšklasterī IB (IB2) ar augstu statistisko atbalstu, kas no citiem sēkleņkoku izolātiem atšķīrās ar divām aminoskābēm Ile<sup>80</sup> un Ser<sup>188</sup>. II klasteris ietvēra MO5 tipa izolātu (AB326225) kopā ar 43 sekvencēm no GenBank, kas iegūtas no dažādiem saimniekiem – kultivētajām ābelēm un kreba ābeles *M. spectabilis*, kultivētajām bumbierēm *Pyrus communis* un citām *Pyrus* sugām (*P. pyrifolia*, *P. bretschneideri*, *P. betulifolia*, *P. calleryana*) un *Crataegus pinnatifida*. Lielākā daļa šo izolātu nāk no Ķīnas, divi no Japānas un Taivānas. ACLSV izolātu filoģenētiskā rekonstrukcija no *Malinae* apakštribas saimniekaugiem liecina, ka pastāv vismaz trīs ACLSV ģenētiskie tipi – B6, P205 un MO5 (Yaegashi et al., 2007; Chen et al., 2014). Filoģenētiskie pētījumi atklāja, ka visi analizētie Latvijas ACLSV izolāti no sēkleņkokiem pieder pie diviem ģenētiskajiem tiptiem (B6 un P205), kas ir izplatīti arī savvaļā. Vīrusa B6 un P205 ģenētiskie tipi ir izplatīti visā pasaulē un, iespējams, ir izplatījušies ar inficētu stādāmo materiālu, galvenokārt Malling (M) un Malling-Merton (MM) sērijas klona potcelmiem (Šutić et al., 1999). Ģenētiskais tips MO5 no B6 atšķīrās tikai ar divām aminoskābju pozīcijām un konstatēts *Malus*, *Pyrus* un *Crataegus* augiem Ķīnā.



3.1. att. *Malinae* apakštribas augu ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīrusa izolātu novietojums IA apakšklasterī, balstoties uz vīrusa apvalka proteīnu kodējošā gēna sekvenču filoģenētisko analīzi ar *Maximum Parsimony* metodi datorprogrammā PAUP/

Fig. 3.1. Placement of apple chlorotic leaf spot virus isolates of the subtribe *Malinae* in subcluster IA, based on phylogenetic analysis of virus coat protein gene sequences with the *Maximum Parsimony* method in the PAUP computer program

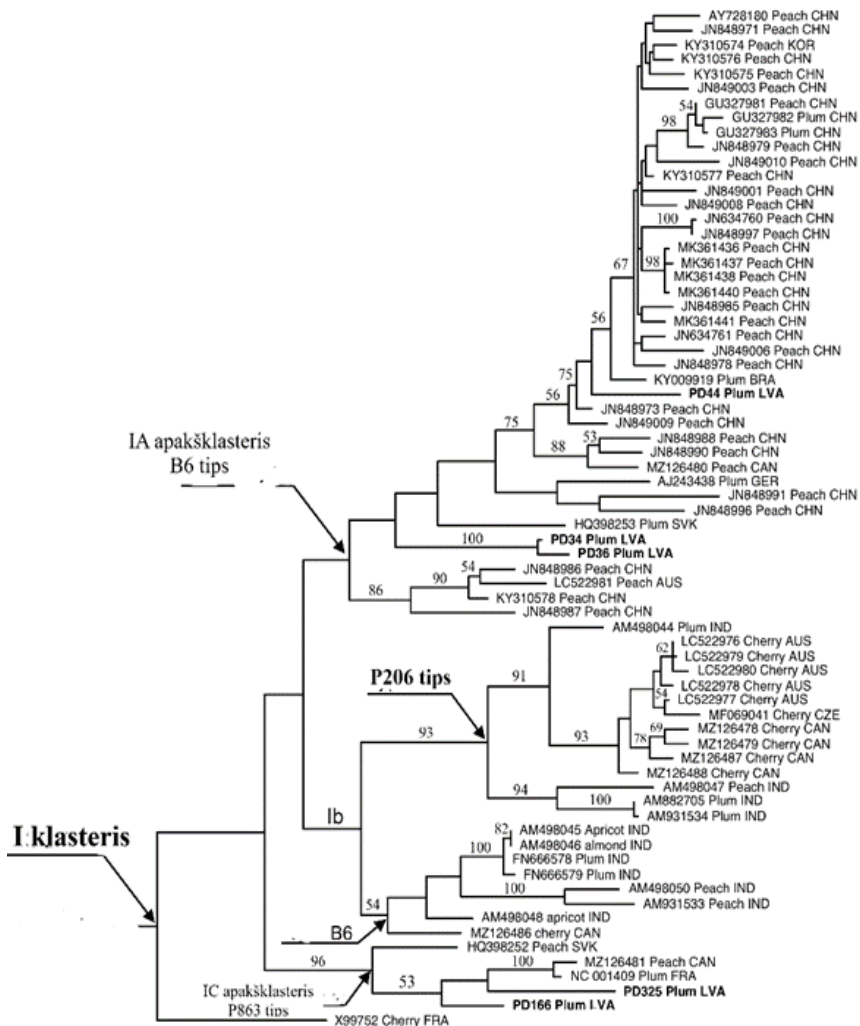
Šajā pētījumā iegūtie izolāti attēloti treknrakstā/ In this study obtained isolates are shown in bold.



No mandeļu tribas (*Amygdaleae*) saimniekaugiem (*Prunus domestica*, *P. armeniaca*, *P. avium*, *P. cerasoides*, *P. domestica*, *P. dulcis*, *P. persica* un *P. salicina*) izdalīto vīrusa izolātu filoģenētiskās analīzes sadalīja to sekvenses divos lielos klasteros (klasteris I un II) ar augstu statistisko atbalstu (III publikācija). Pirmais lielais klasteris veidojās no trīs apakšklasteriem (apakšklasteri IA, IB un IC). Tāpat kā sēkleņkoku izolātiem, iedalījums apakšgrupās nebija saistīts ar ģeogrāfisko izcelsmi vai saimniekaugiem. Apakšklasterī IB desmit izolāti no *Prunus avium* kopā ar četrām ACLSV izolātu sekvensēm no *P. cerasoides*, *P. persica*, *P. domestica* un *P. salicina* veidoja atsevišķu apakšgrupu (IB1) ar augstu statistisko atbalstu, kas atšķīrās no apakšklastera IA (42 sekvenses), apakšklastera IB (astoņas sekvenses), apakšklastera IC (piecas sekvenses) un II klastera (25 sekvenses) septiņās aminoskābju sekvenses pozīcijās: Ala<sup>40</sup>-Val<sup>59</sup>-Phe<sup>75</sup>-Ile<sup>86</sup>-Ser<sup>130</sup>-Gly<sup>137</sup>-Met<sup>184</sup>. Savukārt IA apakšklasterī, astoņām sekvensēm no apakšklastera IB un piecām sekvensēm no apakšklastera IC novēroja aminoskābju kovariācijas: Ser<sup>40</sup>-Leu<sup>59</sup>-Tyr<sup>75</sup>-Ala<sup>86</sup>-Thr<sup>130</sup>-Ser<sup>137</sup>-Leu<sup>184</sup>. Apakšklasteris IC atšķīrās no apakšklasteriem IA un IB ar trim aminoskābēm: Ser<sup>14</sup>-Asn<sup>24</sup>-Leu<sup>72</sup>.

II klasteri veidoja 25 ACLSV sekvenses no Ķīnas, kas izdalītas no parastajiem persikiem (*Prunus persica*). Visas II klastera sekvenses atšķīrās no klastera I četrās no iepriekš minētajām septiņām aminoskābju pozīcijām (III publikācija) un papildus divdesmit sešās aminoskābju pozīcijās. Visi Latvijas ACLSV izolāti no *Prunus domestica* sagrupējās apakšklasteros IA un IC (3.3. att.). Trīs Latvijas ACLSV izolāti (PD34, PD36 un PD44) kopā ar 39 citām vīrusa sekvensēm no kultivēto *Prunus domestica*, *P. persica* un *P. salicina* augiem sagrupējās IA apakšklasterī. Pārējie divi Latvijas ACLSV izolāti no plūmēm (PD166 un PD325), kopā ar trim vīrusa izolātiem no *P. domestica* (tipa izolātu P863; NC\_001409) un *P. persica* (HQ398252, MZ126481) izveidoja apakšklasteri IC ar augstu statistisko atbalstu (3.3. att.).

ACLSV izolātu filoģenētiskā rekonstrukcija no *Amygdaleae* tribas saimniekaugiem šajā pētījumā liecināja, ka pastāv vismaz četri ACLSV ģenētiskie tipi. B6 un P205 tipus iepriekš definēja Yaegashi et al., 2007, izmantojot piecu aminoskābju ko-variācijas (Ala<sup>40</sup>-Val<sup>59</sup>-Phe<sup>75</sup>-Ser<sup>130</sup>-Met<sup>184</sup> vai Ser<sup>40</sup>-Leu<sup>59</sup>-Tyr<sup>75</sup>-Thr<sup>130</sup>-Leu<sup>184</sup>). Šajā pētījumā P863 tika atzīts par atšķirīgu ģenētisko tipu, pamatojoties uz iepriekš identificētu celmu P863 (German et al., 1990), kas saistīts ar mizas plaisāšanas slimību *P. domestica* augiem. P863 tips definēts, pamatojoties uz piecām ACLSV sekvensēm, kas veidoja augsti atbalstītu filoģenētisko līniju un kurām bija raksturīga tāda pati aminoskābju kovariācija kā B6 tipam ar trīs aminoskābju aizstāšanu vīrusa apvalka proteīnā: Ser<sup>14</sup>-Asn<sup>23</sup>-Leu<sup>72</sup>.



3.3. att. *Amygdaleae* tribas ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīrusa izolātu novietojums I klasterī, balstoties uz vīrusa apvalka proteīnu kodējošā gēna sekvenču filogēnētisko analīzi ar *Maximum Parsimony* metodi datorprogrammā PAUP/

*Fig. 3.3. Placement of apple chlorotic leaf spot virus isolates of tribe Amygdaleae in cluster I, based on phylogenetic analysis of virus coat protein gene sequences with the Maximum Parsimony method in the PAUP computer program*

Šajā pētījumā iegūtie izolāti attēloti treknrakstā/ In this study obtained isolates are shown in bold

*Ta Tao 5* (Marini et al., 2008) ir visatšķirīgākā vīrusa izolātu grupa no citiem ACLSV izolātiem. Tas pārsniedz *Betaflexiviridae* noteiktos sugu demarkācijas kritērijus un visticamāk pārstāv jaunu vīrusu sugu, kā iepriekš ierosinājis Zhou et al. (2018). Viszemākā *Ta Tao 5* tipa CP sekvenču identitāte bija ar *Malus* izolātiem (66.5% nukleotīdu sekvenču identitāte un 68.0% aminoskābju identitāte), un visā CP gēnā bija vairāk nekā 25 aminoskābju aizvietošanas gadījumu. Tomēr *Ta Tao 5* tipa izolātiem bija tādas pašas aminoskābju aizstāšanas pozīcijās Ser<sup>40</sup> un Tyr<sup>75</sup> kā B6 tipa izolātiem, kas norāda, ka šīs aminoskābju kombinācijas ir būtiskas efektīvai replikācijai saimniekaugā, ne tikai ACLSV (Yaegashi et al., 2007), bet arī citiem *Trichovirus* ģints vīrusiem.

No dažādiem saimniekaugiem - mandelēm, aprikozēm, ābelēm, persikiem, bumbierēm, plūmēm un vilkābelēm izdalīto vīrusu izolātu filoģenētiskās analīzes parādīja, ka sekvenču grupēšanās nav saistīta ne ar to ģeogrāfisko izcelsmi, ne to saimniekaugiem. B6 un P205 ģenētiskais tips ir sastopams gan sēkleņkoku, gan kauleņkoku vīrusa izolātiem, kas norāda uz to kopīgo izcelsmi un iespējams, ka dabā pastāv neatklāts vīrusa vektors vai agrāk ir pastāvējis vīrusa vektors, kas to izplatījis starp dažādiem Rosaceae ģints augiem. Strauji attīstoties augļkopības nozarei un intensīvi veģetatīvi pavairojot augu materiālu, iespējams pavairots un izplatīts arī defektīvs vīrusa genoms. Izmainoties vīrusa sekvenču, mainās arī tā atbilstība vektoram, līdz ar to vīruss evolūcijas gaitā iespējams ir zaudējis spēju izplatīties ar vektoru starpniecību.

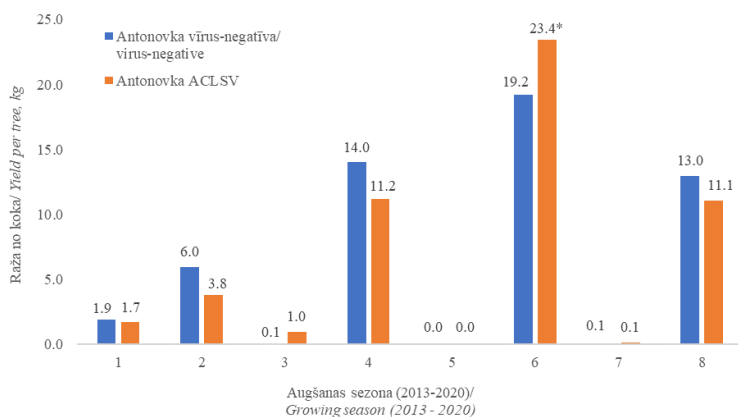
### 3.5. ACLSV ietekme uz ražu un veģetatīvo augšanu

Izmēģinājums iekārtots pēc randomizēto bloku principa trīs atkārtojumos. Katrs no blokiem sastāvēja no trīs ACLSV inficētiem un trīs vīrus-negatīviem kokiem no katras šķirnes (IV publikācija). Kopā 18 koki no katras šķirnes. Izmēģinājuma laikā koki vizuāli pārbaudīti uz vīrusa simptomiem: hlorotiski gredzeni un loki uz lapām vai rūsgani gredzeni uz augļiem. Vīrusa infekcijas pazīmes netika novērotas visā izmēģinājuma periodā. Visi koki sākotnēji testēti uz ApMV, ACLSV, ASGV un ASPV klātbūtni ar RT-PCR. Testu otrreiz atkārtoja izmēģinājuma beigās. Datu analīzei atlasīja kokus, kuriem abi testa rezultāti bija vienādi: deviņi ACLSV inficēti un seši vīrus-negatīvi koki šķirnei 'Antonovka' un trīs inficēti un 14 vīrus-negatīvi koki šķirnei 'Gita'. Statistiskās analīzes ar SPSS veiktas, ņemot vērā nevienlīdzīgo izlases lielumu katram faktoram.

Lai gan ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīrusa daļiņas uzkrājas lapu un sakņu floēmas un parenhīmas šūnās, ietekmējot cukuru plūsmu visā augā, kas var nelabvēlīgi ietekmēt augu augšanu un ražu (Kreuze et al., 2011). Astoņu sezonu laikā (2013 – 2020) abām šķirnēm statistiski ticamu ACLSV negatīvu ietekmi uz augu ražu nenovēroja. Parasti vīrusa infekcijas ietekme uz koku ir atkarīga gan no šķirnes, gan arī no potcelma (Posnette, 1989). Šajā pētījumā izmantotais potcelms B396 ir cēlies no sarkanlapu paradīzes ābeles (B9), kuru



uzskata par tolerantu pret latento vīrusu infekciju (Cummin & Aldwinckle, 1983), iespējams tāpēc statistiski pierādāma ar augstu ticamību ACLSV negatīvā ietekme uz ābeļu augšanu un ražu netika konstatēta ( $p = 0.13$ ). Statistiskā datu analīze norāda uz salīdzinoši statistiski augstu vērtējamu faktoru mijiedarbību ( $p = 0.06$ ), tādejādi kopējā raža astoņu gadu laikā šķirnei 'Antonovka' vīrus-negatīviem kokiem bija augstāka nekā ar vīrusu inficētiem kokiem (attiecīgi 52.3 kg un 50.6 kg), bet kopējā raža astoņu gadu laikā no šķirnes 'Gita' ACSV inficētiem kokiem bija augstāka, nekā vīrus-negatīviem kokiem (attiecīgi 101.1 kg un 86.4 kg). Starp šķirnēm ar būtiski augstāku ražu (1.8 reizes) izcēlās šķirne 'Gita' ( $p < 0.01$ ; (4.70781 E-11)). Periodiski (2013., 2014., 2016. un 2020. gadā) šķirnes 'Antonovka' ACLSV inficētajiem kokiem konstatēja zemāku ražas daudzumu no koka, nekā vīrus-negatīvajiem kokiem (3.4. att.)

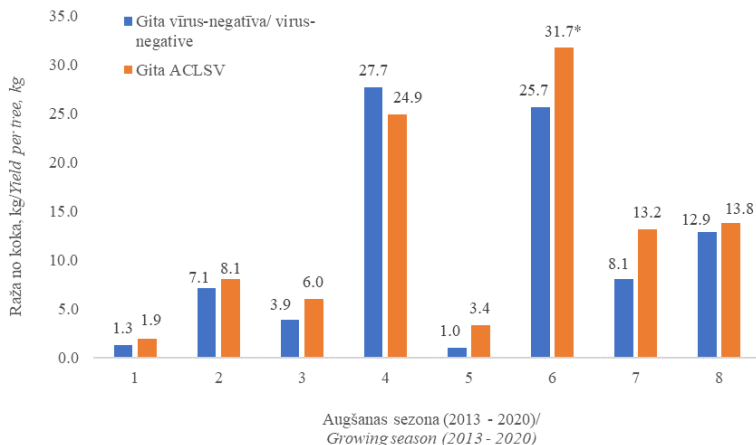


3.4. att. Vidējā raža no koka (kg) ābeļu šķirnei 'Antonovka', ACLSV inficēto un vīrus-negatīvo koku salīdzinājums no 2013. līdz 2020. gadam/  
Fig. 3.4. Average yield per tree (kg) for apple cultivar 'Antonovka', comparison of ACLSV-infected and virus-negative trees from 2013 to 2020

\* parāda statistiski būtisku atšķirību ( $p \leq 0.05$ ) / shows a statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ )

Savukārt šķirnes 'Gita' ACSV inficētiem kokiem bija augstāka raža no koka visa izmēģinājuma laikā, izņemot 2016. gadā (3.5. att.), kad lielāku ražu no koka (kg) konstatēja vīrus-negatīviem kokiem (attiecīgi 27.7 kg un 24.9 kg).

Statistiski nozīmīgu atšķirību ( $p = 0.02$ ) starp ACLSV inficētiem un vīrus negatīviem kokiem ražas daudzumā no viena koka konstatēja 2018. gadā, kad abām šķirnēm novēroja būtiski augstāku ražas apjomu no ACLSV-inficētajiem kokiem.



3.5. att. Vidējā raža no koka (kg) ābeļu šķirnei ‘Gita’, ACLSV inficēto un vīrus-negatīvo koku salīdzinājums no 2013. līdz 2020. gadam/  
Fig. 3.5. Average yield per tree (kg) for apple cultivar ‘Gita’, comparison of ACLSV-infected and virus-negative trees from 2013 to 2020

\* parāda statistiski būtisku atšķirību ( $p \leq 0.05$ )/ shows a statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ )

Nav datu par šķirnes ‘Antonovka’, ‘Gita’ un potcelma B396 reakciju uz latento vīrusu infekciju. Pēc literatūras datiem, visas komerciālās šķirnes un potcelmi no East Malling un Malling Merton sērijām tiek uzskatīti par izturīgiem pret latento vīrusu infekciju (Mink, 1989). Iepriekš veiktos pētījumos Anglijā (‘Cox’s Orange Pippin’, ‘Golden Delicious’, ‘Discovery’ un ‘Laxton’s Superb’ uz potcelma MM106) un Nīderlandē (‘Golden Delicious’ uz M26) pierādīja, ka latento vīrusu (ACLSV, ASPV un ASGV) infekcija var samazināt koka izmēru par aptuveni trešdaļu, bet savukārt ražas efektivitāte proporcionāli nesamazinās (Meijneke et al. 1973; Cummins et al. 1979; Campbell, 1980). Tomēr pētījumos ASV (‘Idared’, ‘Delicious’ un ‘Golden Delicious’ uz M26, MM102, MM106 un MM111) nekonstatēja, ka latento vīrusu infekcija spēj samazināt augšanu vai ražu (Cummins & Aldwinckle, 1983), kas arī atbilst šajā pētījumā iegūtajiem rezultātiem.

Arī ACLSV klātbūtne augos nepierādīja statistiski būtisku negatīvu ietekmi uz augļa svaru, lai gan abām šķirnēm vīrus-negatīvie koki periodiski deva lielākus augļus nekā ar ACLSV inficētie koki. Šķirnes ‘Antonovka’ kopējais

vidējais augļu svars astoņu gadu laikā bija lielāks ACLSV negatīviem kokiem, nekā ar vīrusu inficētiem kokiem (attiecīgi 218g un 209g), bet šķirnei 'Gita' kopējais vidējais augļu svars bija augstāks inficētajiem kokiem nekā vīrus-negatīvajiem kokiem (attiecīgi 206g un 186g). Vidējais augļa svars svārstījās starp gadiem un statistiski būtisku atšķirību ( $p = 0.04$ ) novēroja pirmajā gadā, kad abām šķirnēm ar ACLSV inficētie koki deva lielākus augļus, nekā vīrus-negatīvie koki. Būtisku vidējo augļa svara atšķirību (mijiedarbības  $p$  vērtība 0.03) starp ACLSV inficētajiem un vīrus-negatīvajiem kokiem novēroja šķirnei 'Gita' astotajā gadā pēc stādīšanas, kad vidējais augļa svars bija lielāks ACLSV inficētajiem kokiem nekā vīrus-negatīvajiem kokiem, bet šķirnei 'Antonovka' tas bija pretēji.

Aprēķinātie augšanas parametri parādīja nelielas atšķirības starp ACLSV inficētajiem un vīrus-negatīvajiem kokiem. Stumbra šķēsgriezuma laukuma (TCSA) attiecība vīrus-negatīvajiem un ACLSV inficētajiem kokiem stādīšanas laikā būtiski neatšķīrās, bet pēc astoņiem gadiem statistiski nebūtiski lielāks pieaugums tika novērots vīrusa negatīviem kokiem, nekā ar ACLSV inficētiem kokiem ( $p = 0.80$ ). Būtiski lielāku koka vainaga tilpumu konstatēja ACLSV inficētiem kokiem ( $p = 0.01$ ). Statistiski nenozīmīgu augstāku kumulatīvās ražas efektivitāti (kumulatīva raža uz TCSA) novēroja ar ACLSV inficētajiem kokiem ( $p = 0.81$ ). Lielāku kumulatīvās ražas daudzumu (kg) uz vainaga tilpumu ( $m^3$ ) konstatēja vīrus-negatīvajiem kokiem ( $p = 0.07$ ).

Pētījumā iegūtie dati par ACLSV ietekmi uz šķirni 'Gita' ir pretrunā ar iepriekšējiem pētījumiem, kas pierāda vīrusu negatīvo ietekmi uz ābeļu ražu un augšanu (Šutić et al., 1999). Iespējams, ka nepietiekamais šķirnes 'Gita' ACLSV inficēto koku skaits (trīs koki), kas izmantoti šajā izmēģinājumā, varēja ietekmēt ievāktu datu precizitāti. Izmēģinājums sākotnēji bija plānots ar deviņiem ACLSV inficētiem un vīrusu negatīviem kokiem, bet pēc RT-PCR testa rezultātiem daudzi šķirnes 'Gita' koki bija vīrus-negatīvi, un arī daudzi acotie pumpuri no ACLSV inficētā mātes auga nepieauga, iespējamās nesaderības dēļ, ko izraisa ACLSV (Mink, 1989). Arī ierīkojot izmēģinājumu no atlasītiem vīrus-negatīviem augiem nevis vīrusbrīviem augiem pēc termoterapijas, tas varēja ietekmēt ražas un augšanas parametru rādītājus eksperimentā. Līdzīgs novērojums iegūts pētījumā, kurā salīdzināts potcelms M9 pēc termoterapijas ar vīrus-negatīvu potcelmu M26, kur kumulatīvā raža uz stumbra šķēsgriezuma laukuma bija augstāka kokiem, kuri bija acoti uz vīrusbrīviem potcelmiem pēc termoterapijas (Koike et al., 1993). Tāpēc nevar izslēgt, ka pastāv vēl kāds neidentificēts latentais vīruss šķirne 'Gita' vīrus-negatīvajos kokos, kas samazināja veģetatīvo augšanu un ražu.

### 3.6. ACLSV eliminācijas iespējas un termoterapijas efektivitāte

Paaugstinātu vides temperatūru plaši izmanto vīrusu eliminēšanai augos, tostarp ābelēm (Welsh & Nyland, 1965; Lenz & Lankes, 2006). Augsta temperatūra kavē vīrusa replikāciju un pārvietošanos augu audos, tāpēc termoterapija var ievērojami uzlabot vīrusu eliminācijas efektivitāti (Mink et al., 1998). Tomēr temperatūra un ekspozīcijas laiks ir ierobežots, jo atšķiras augu sugu un genotipu tolerance pret paaugstinātu temperatūru (Stein et al., 1991). Ābeļu izdzīvošana termoterapijas laikā svārstījās no 45% līdz 100% atkarībā no termoterapijas apstākļiem un augu genotipa (V publikācija). Augu skaits, kas izdzīvoja pēc termoterapijas, līdz nākamajai sezonai svārstījās no 12% līdz 62%. Pēc termoterapijas lielākā daļa augu no kandidātmateriāla 1/2007/2009 un 2/2008/2010 neizdzīvoja līdz nākamajai augšanas sezonai; atlikušajiem augiem novēroja pazeminātu vitalitāti un tie nākamajā veģetācijas sezonā aizgāja bojā. Kad termiskās apstrādes ilgumu samazināja līdz 40 dienām un adaptācijas periodu pagarināja līdz septiņām dienām, izdzīvojušo augu skaits pēc termoterapijas paaugstinājās un arī tie veiksmīgi pārziemoja (kandidātmateriāls 5/2012/2013). Lai gan bumbieres uzskata par jutīgākām pret ilgstošu augstu temperatūru nekā citas kokaugu sugas (Papstein et al., 2009), pētījumā bumbieres izturēja termoterapiju labāk nekā ābeles, kur 71% – 100% bumbieru augu izdzīvoja termoterapijas laikā. Galvenā problēma bija zemā augu izdzīvošanas spēja pēc termoterapijas, jo daļa uzacoto augu jaunie dzinumi nepaspēja pārkoksnēties, tāpēc lielāko daļu bumbieru kandidātaugus zaudēja pēc pārziemošanas. Pārziemojušo augu skaits uz nākamo sezonu svārstījās no 0 līdz 36%, tikai augi no kandidātmateriāla 4/2010/2012 un 5/2012/2013 pārziemoja vairākas sezonas.

Mātes augus izvēlējās no ābeļu ģenētisko resursu kolekcijām vai lauka izmēģinājumiem. Tikai atsevišķas vietējās ābeļu šķirnes ‘Zane’, ‘Baiba’, ‘Gita’, ‘Edīte’, ‘Roberts’, ‘Ligita’, ‘Dace’ un ‘Uldis’, kas izveidotas Dārzkopības institūtā nesenās valsts selekcijas programmās, bija bez vīrusu vai ar viena vīrusa infekciju. Daudzi no pārbaudītajiem ābeļu šķirņu mātes augiem bija inficēti ar diviem vai trīs vīrusiem. Dažu ābeļu šķirņu mātes augi, piemēram, ‘Rubin’ un ‘Ausma’ bija inficēti ar visiem četriem pārbaudītajiem vīrusiem. No pārbaudītajām bumbieru šķirņu mātes augiem konstatēja viena vīrusa infekciju vai arī vīrusi netika atklāti. Uzacotajiem kandidātmateriāla 1/2007/2009 augiem nākamajā gadā pēc termoterapijas vīrusus nekonstatēja. Tomēr otrajā sezonā pēc termoterapijas ābelēm ‘Sinap Orlovskij’ konstatēja ASGV, bet bumbierei ‘Condo’ izdevās eliminēt ACLSV. Pagarinot termoterapijas izturēšanas laiku, šķirnei ‘Sinap Orlovskij’ (kandidātmateriāls 2/2008/2010), kurai bija vairāku vīrusu infekcija, varēja efektīvi eliminēt ACLSV, bet šķirnes ‘Auksis’ kokiem joprojām varēja konstatēt ACLSV un ASPV. Šķirnei ‘Ausma’ (kandidātmateriāls 3/2009/2011), kurai bija trīs vīrusu infekcija, pēc

termoterapijas saglabājās ASGV un ASPV. Savukārt bumbieres, kuras bija inficētas ar vairākiem latentajiem vīrusiem, neizdzīvoja termoterapijas laikā.

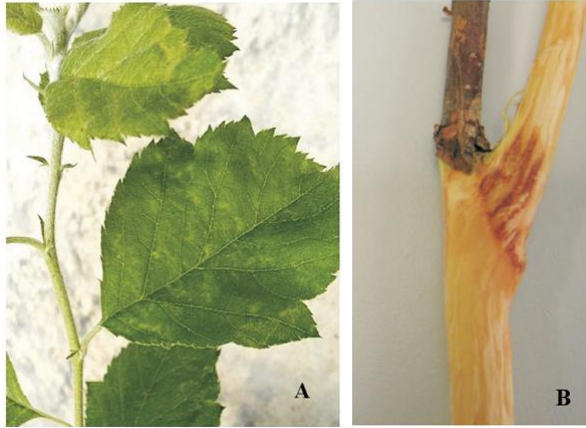
Lai palielinātu izdzīvojušo augu skaitu pēc termoterapijas, kandidāta materiālam 4/2010/2012 termoterapijas ilgumu samazināja no 70 dienām uz 40. Pēc termoterapijas dažos augos ābeļu šķirnēm 'Dace' un 'Zarja Alatau' varēja konstatēt ACLSV, bet bumbierēm 'Mļejevskaja Raņņaja' un 'Mramornaja' izdevās veiksmīgi eliminēt latentos vīrusus. Lai uzlabotu augu vitalitāti un veicinātu ātrāku jauno dzinumumu augšanu, saīsināja termoterapijas ilgumu līdz 40 dienām un temperatūru tumsas periodā pazemināja līdz 30 °C (kandidātmateriāls 5/2012/2013). Jaunizveidotus augus pēc dzinumumu galu potēšanas testēja nākamās trīs sezonas pēc termoterapijas ar RT-PCR. ACLSV un ApMV bija veiksmīgi eliminēti no inficētajiem ābeļu un bumbieru augiem, tomēr līdzīgi kā citus gadus atsevišķi ābeļu un bumbieru augi palika inficēti ar ASGV vai ASPV.

Termoterapijas efektivitāti ietekmē vīrusu jutība pret paaugstinātu temperatūru (Campbell & Best, 1968), kā arī iegūto rezultātu nosaka izmantotās diagnostikas metodes ticamība, vai tā ir pietiekami jutīga, lai noteiktu vīrusu pat zemā koncentrācijā. Starp metodēm, ko izmanto vīrusu infekciju noteikšanai RT-PCR tiek uzskatīts par ticamāko un jutīgāko metodi (Reed & Foster, 2011). Tomēr RT-PCR efektivitāte ir atkarīga no izdalītās RNS kvalitātes, jo liels polifenolu savienojumu un polisaharīdu daudzums augļu koku lapās var inhibēt RT-PCR (MacKenzie et al., 1997; Deng et al., 2004). Tāpēc augu RNS *Nad5* gēnu izmanto kā iekšējo kontroli, lai pārbaudītu PCR kvalitāti, kas ir īpaši svarīgi gadījumos, ja ir negatīvi rezultāti (Menzel et al., 2002). Parasti pēc termoterapijas iestājas ilgs latentais periods, kad vīrusi var nebūt nosakāmi, jo augos ir zema vīrusu koncentrācija (Leonhardt et al., 1998). Pētījumā to varēja novērot ābeļu šķirnēm 'Sinap Orlovskij' (kandidātmateriāls A1/2007/2009) un 'Auksis' (A5/2012/2013), bumbieru šķirnei 'Jumurda' (P5/2012/2013). RT-PCR testa rezultāti bija negatīvi pirmajos gados pēc termoterapijas, bet tikai trešajā gadā ar RT-PCR konstatēja ASPV un ASGV infekciju, kad vīrusa koncentrācija augu audos bija sasniegusi nosakāmu līmeni.

Daži ābeļu kandidātaugi šķirnēm 'Dace', 'Rubin' un 'Zarja Alatau' palika inficēti pēc termoterapijas un testu rezultāti bija pozitīvi jau pirmajā pārbaudes gadā. Termoterapijas efektivitāte ir atkarīga ne tikai no vīrusa un termoterapijas apstākļiem, bet arī no vīrusa un konkrētā auga genotipa mijiedarbības (Papstein et al. 2008). Lai gan ACLSV ir salīdzinoši viegli eliminēt no augļu kokiem ar īsu termoterapijas periodu (Campbell & Best, 1964), ābeļu šķirnes 'Zarja Alatau' un 'Dace' palika inficētas ar ACLSV pat pēc 60 dienu ekspozīcijas paaugstinātā temperatūrā. ASGV un ASPV replicējas augu kambijā un ir nevienmērīgi izplatīts augu audos; tāpēc šos vīrusus ir grūtāk eliminēt un arī to noteikšana ir sarežģīta (Desvignes, 1999; Gugerli & Ramel, 2003). Vairāku vīrusu infekciju augos, jo īpaši kopā ar ASGV, ir grūtāk eliminēt (Laimer & Barba, 2011), jo ASGV ir uzskatāms kā stabils vīruss, un paaugstināta temperatūra nepietiekami nomāc šī vīrusa replikāciju un tālāku izplatīšanos augā (Knapp et al., 1995). Pēc

termoterapijas ar RT-PCR testētie augi uzrādīja ASGV un ASPV klātbūtni ābeļu šķirņu ‘Ausma’, ‘Baltais Dzidrais’, ‘Liberty’, un ‘Rubin’ augos, bet vēlākos gados šajos augos vīrusus nekonstatēja, jo augu uzturēšana siltumnīcas apstākļos arī var ietekmēt vīrusu nevienmērīgu izplatību augos un tos ir grūtāk konstatēt. Augļu koku vīrusu plašo izplatību Latvijā ir veicinājuši inficētu klona potcelmu un inficētu mātes koku pavairošana. Tāpēc atlasīt mātes kokus bez vīrusu infekcijām augļu dārzos kandidātmateriāla izveidei šajā pētījumā nebija iespējams. Daudzas šķirnes bija inficētas ar vismaz diviem vīrusiem un palika inficētas pat pēc 60 – 70 dienu ilgas termoterapijas. ACLSV jauktu infekciju gadījumā ir tolerants pret paaugstinātu temperatūru (Knapp et al., 1995), ko novēroja ābeļu šķirnēm ‘Dace’ un ‘Zarja Alatau’, kur ACLSV netika eliminēts. Lai gan citām šķirnēm nenovēroja jaukto vīrusu infekciju ietekmi uz ACLSV elimināciju. Iespējams, ka mijiedarbība starp vīrusu un konkrēto auga genotipu arī var ietekmēt atveseļošanas efektivitāti. ApMV bija konstatēts ābeļu un bumbieru mātes augos pirms termoterapijas un dažiem augiem tas saglabājās arī pēc termoterapijas, lai gan ApMV nav termostabils un, ja nav kombinācijā ar citiem vīrusiem, tad var izzust gadu gaitā bez termoterapijas (Laimer & Barba 2011).

Atsevišķi augi no deviņām ābeļu šķirnēm (kandidātmateriāls 3/2009/2011), kuri bija negatīvi ar RT-PCR uz visiem testētajiem vīrusiem, tālāk tika pārbaudīti ar kokveida indikatoraugu testu uz četriem vīrusiem (ApMV, ACLSV, ASGV, ASPV) (V publikācija). Pēc astoņām nedēļām neviens no pārbaudītajiem kandidātaugiem neuzrādīja vīrusu infekcijai raksturīgus simptomus. Tomēr uzacotiem *Malus platycarpa* augiem, kuriem bija uzpotēta šķirne ‘Rubin’, kuru izmantoja kā testa pozitīvo kontroli, divas nedēļas pēc pumpuru uzacošanas varēja novērot hlorotiskus gredzenus uz lapām, kas raksturīgi ACLSV infekcijai (3.6. A att.). Savukārt *Malus pumila* ‘Virginia Crab’ potējuma vietā varēja novērot nekrotiskas rievās koksni, kas liecināja par ASGV infekciju (3.6. B att.). Negatīvās kontroles augiem no *M. platycarpa* un *M. pumila* ‘Virginia Crab’ neizpaudās šādi simptomi un, palika bez jebkādam pazīmēm, kas norādītu uz vīrusu infekcijām. ApMV un ASPV simptomi netika novēroti uz kokveida indikatoraugiem, kuriem bija uzacota pozitīvā kontrole (šķirne ‘Rubin’).



**3.6. att. ACLSV izraisīti hlorotiski grezneni un līniju raksts uz indikatorauga *Malus platycarpa* lapām (A) un ASGV izraisītas nekrotiskas rievās kambijā, acojuma vietā indikatoraugam *Malus pumila* ‘Virginia Crab’ (B)/**

**Fig. 3.6. *ACLSV-induced chlorotic rings and line pattern on the leaves of the indicator plant *Malus platycarpa* (A) and necrotic grooves in the cambium caused by ASGV, at the graft union of the indicator plant *Malus pumila* ‘Virginia Crab’ (B) (Zulģe et al., 2017)***

No atveseļotajiem 72 ābeļu un desmit bumbieru kandidātaugiem, 63 augi no 24 ābeļu šķirnēm un deviņi augi no sešām bumbieru šķirnēm, vairākus gadus pēc termoterapijas uzrādīja negatīvus rezultātus ar RT-PCR uz ApMV, ACLSV, ASGV un ASPV. Šie augi var kvalificēties kā vīrus-testēti mātes augi. Lai apstiprinātu vīrusbrīvo kandidātaugu statusu, nepieciešama testēšana ar kokveida indikatoraugiem lauka apstākļos, kur simptomu attīstībai parasti nepieciešami divi līdz trīs gadi un līdz pat pieciem gadiem simptomu novērtēšanai (Panattoni et al., 2013). Lai iegūtu augļu kokus, kas kvalificējas atbilstoši vīrusbrīvā materiāla standartiem, pait vairāk nekā desmit gadi (Van der Berg, 2003; Rowhani et al., 2005; Lenz & Lankes, 2006). Tas galvenokārt ir saistīts ar laiku, kas nepieciešams koku pavairošanai, vairākkārtējai termoterapijai un testēšanai ar kokveida indikatoraugiem, lai apstiprinātu kandidātaugu vīrusbrīvo statusu. Pētījumā galvenais iemesls zemajam kandidātaugu iznākumam bija mātes koki ar vairāku vīrusu infekciju un samazinātu augu vitalitāti pēc termoterapijas, kā rezultātā daudzi atveseļotie augi pēc termoterapijas aizgāja bojā.

## SECINĀJUMI

1. ACLSV ir plaši sastopams visā Latvijas teritorijā (sastopamība ābeļdārzos sasniedz līdz pat 65.4%, bumbieru stādījumos līdz 32.3%, bet plūmju stādījumos līdz 2.0%). ACLSV sastopamība Latvijā ir līdzīga kā citās valstīs, kur tā sasniedz 33 līdz 100%, ja augļu dārzu ierīkošanai neizmanto vīrusbrīvu stādmateriālu. Būtiski augstāka ACLSV sastopamība ir ābeļdārzos, kur izmantoti klona potcelmi. Vairākām ābeļu šķirnēm konstatēja augstu pozitīvo gadījumu skaitu, kas norāda uz inficēta stādmateriāla (potzari, potcelmi) pavairošanu un apriti, kas ir veicinājis vīrusa izplatību augļu dārzos, un apstiprināja iepriekšējos pētījumus, ka daudzas vietējās un introducētās ābeļu šķirnes un potcelmi ir inficēti ar ACLSV.
2. ACLSV ābeļu apakštribas (*Malinae*) un mandeļu tribas (*Amygdaleae*) saimniekaugu izolātu CP gēna sekvenču filoģenētiskā rekonstrukcija parādīja, ka Latvijā ir izplatīti trīs ACLSV ģenētiskie tipi: B6 un P205, kuri ir sastopami gan ābelēs un bumbierēs, gan plūmēs, bet P863 tips ir sastopams tikai plūmēs. Tas parāda vīrusa ģenētisko tipu atšķirīgo izcelsmi, parādot, ka gan sēkleņkoku, gan kauleņkoku vīrusa izolātiem pastāv kopīga izcelsme, kas savukārt norāda uz iespējamu vektora esamību dabā.
3. Pētījumā, lauka apstākļos, izmantojot vīrus-negatīvus un ACLSV inficētus augus, secināja, ka ābeļu hlorotiskās lapu plankumainības vīrusam nav statistiski būtiskas ietekmes uz ābeļu šķirņu ‘Antonovka’ un ‘Gita’ ražas daudzumu un stubra šķērsriezuma laukuma pieaugumu. Pētījumā konstatēja, ka ACLSV inficētajiem kokiem būtiski paaugstinās koka vainaga tilpums, bet būtisku ietekmi uz kumulatīvās ražas attiecību pret vainaga tilpumu tas nerada.
4. Pētījumā pierādījās, ka termoterapija var būt efektīva arī vairāku vīrusu infekcijas gadījumā. Augu atveseļošanas efektivitāti ietekmēja mijiedarbība starp vīrusu un konkrētā auga genotipu, auga genotipa tolerance pret paaugstinātu vides temperatūru un tā reģenerācijas spējas.



## PRIEKŠLIKUMI

1. Ņemot vērā augsto vīrusu izplatību augļu dārzos un ģenētisko resursu kolekcijās, lai ierobežotu tālāku vīrusu izplatību augļu dārzos, ir jāveic ģenētisko resursu monitorings un jāierīko vīrus-negatīvu mātes augu stādījums, kas ļautu nodrošināt, ka augļu dārzu ierīkošanā izmantos kvalitatīvu stādmateriālu.
2. Ņemot vērā konstatēto ACLSV sastopamību savvaļā augošajās ābelēs, turpmākie pētījumi būtu jāveic saistībā ar vīrusu hipotētiskajiem izplatīšanās veidiem, fokusējoties uz iespējamiem bezmugurkaulnieku vektoriem un vīrusa potenciālo izplatīšanos ar inficētām sēklām.

## PATEICĪBAS

Pirmkārt, es pateicos darba vadītājām Ingai Moročko-Bičevskai un Inārai Turkai par atbalstu, konsultācijām un motivāciju publikāciju un visa promocijas darba izstrādes laikā. Dārzkopības institūta kolēģiem par sniegto atbalstu darba rakstīšanas laikā. Īpašs paldies Edītei Kaufmanei par sniegto iespēju, atbalstu, vispārīgiem padomiem un sniegto uzticību. Izsaku pateicību pārējiem Dārzkopības institūta kolēģiem par palīdzību darba izstrādē. Liels paldies manai ģimenei, īpaši vecākiem, kas sniedza iespēju novest iesākto līdz galam. Īpašs paldies Uldim Verneram Brūnam, par to, ka piekrita īsā laikā izrediģēt tekstu angļu valodā.

Pateicība ESF projektam Nr. 8.2.2.0/20/I/001 „LLU pāreja uz jauno doktorantūras finansēšanas modeli”, kura sniegtais finansējums deva iespēju realizēt daļu no šī pētījuma.

# 1. GENERAL DESCRIPTION OF THE THESIS

## 1.1. Relevance of the topic

Apple chlorotic leaf spot virus has a wide distribution in many countries around the world, as well as in a relatively wide range of economically important host plants. It infects not only apples, pears, plums, and cherries, but has been found in many other fruit trees and ornamental plants of the Rosaceae family, which are increasingly used in landscaping or have significant importance in the horticultural industry. As the only known transmission pathway of the virus is vegetative propagation, its presence has also been found in several wild species, indicating a much wider range of putative host plants and several potential ways of transmission for the virus. The introduction of new cultivars has contributed to the spread of untested, infected plant material in orchards. In previous studies in Latvia, testing of clonal rootstocks and standard cultivars with the double grafting method on indicator plants, showed that 66.7% of all tested trees were infected with the ACLSV, ASGV and ASPV latent virus complex (Miltiņš & Kilēvica, 1984). Symptoms of leaf spot caused by ACLSV have been observed not only in cultivated fruit trees, but also in wild-growing mountain ash (Miltiņš & Kilēvica, 1984). Many *Malinae* plants (*Amelanchier* × *spicata*, *Crataegus spp.*, and *Malus spp.*) have spread uncontrolled in the wild and have become an invasive alien species (Stalažs, 2021). Therefore, it is important to identify the wild-growing virus host plants, which can act as potential sources of infection. Investigating the virus in wild plants may allow for the discovery of whether there are other virus transmission pathways, in addition to vegetative propagation, and if the virus also spreads in the wild. Currently, it is unknown how widespread ACLSV is in orchards and whether it also occurs in wild plants of the Rosaceae family, and whether different virus genotypes exist between host plants. In Latvia, no recirculation system of healthy planting material has been implemented so far, which would exclude the use of infected material in the establishment of new orchards, and which would allow for an increase in the yield potential. In the case of a mixed virus infection, the yield can be reduced by up to 60% (Campbell, 1962; Posnette et al., 1963), but it is unknown whether ACLSV, without the presence of other viruses, also negatively affects the vegetative growth and yield of apple trees and how significantly it can affect cultivars grown in Latvia. Initially, it would be necessary to create a stock collection of healthy mother plants to limit the spread of virus diseases and to obtain virus-free planting material, which could then be used for propagation and establishment of new orchards.

## 1.2. Research aim, objectives and theses

The aim of the thesis

To detect the occurrence of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) in Latvia and its genetic diversity, to evaluate the influence of the virus on the development and yield of fruit trees, as well as to estimate the efficiency of thermotherapy in the recovery of fruit trees.

According to the aim of study, four research objectives have been advanced.

1. To detect the occurrence of ACLSV in the regions of Latvia, in apple, pear and plum orchards, in conjunction with the assortment of cultivars and rootstock types.
2. To characterize the genetic diversity and the genetic types of ACLSV in apple, pear, and plum isolates.
3. To evaluate the impact of ACLSV on the growth and yield of fruit trees.
4. To estimate the effectiveness of thermotherapy for virus elimination in fruit trees depending on the presence of one or more virus infection in the plants.

Hypothesis

The introduction of apple cultivars and the use of potentially infected planting material in the establishment of orchards has contributed to the wide and uncontrolled spread of ACLSV in orchards, resulting in the development of genetical diverse virus types that negatively influence the vegetative growth and yield of trees, as well as reducing the effectiveness of virus elimination by thermotherapy.

Thesis statements

1. ACLSV is less common in fruit tree orchards that use seedling rootstocks.
2. Virus isolates can be divided into several genetic types based on the co-variations of the virus coat protein coding amino acid sequences.
3. ACLSV significantly affects the development of fruit trees and the volume of yield.
4. Thermotherapy is an effective virus elimination method in cases where plants are infected with only one virus.

### **1.3. Scientific novelty of the study**

The occurrence of ACLSV in orchards and wild plants has been analysed, using molecular biology methods for the first time in Latvia. This study provides new data on the genetic diversity of ACLSV and the spread of genetic types in different host plants, and virus elimination possibilities for Latvian cultivars by thermotherapy have been evaluated for the first time.

### **1.4. Approbation of research results**

The research results have been summarised in five scientific publications and presented in eight international scientific conferences (see pages 8 – 10).

### **1.5. Thesis structure**

The doctoral thesis consists of five research articles. The distribution of apple chlorotic leaf spot virus in apple, pear and plum orchards has been analysed in the first two publications (publication I and II). The genetic diversity of ACLSV has been characterized in a third (III) research article. The influence of ACLSV on two apple cultivars – ‘Gita’ and ‘Antonovka’ has been analysed in the fourth (IV) publication, while virus elimination possibilities with thermotherapy for apple and pear trees has been evaluated in the fifth (V) publication.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Plant material and conditions for experiments

#### 2.1.1. Survey of orchards and collection of samples

The collection of samples for determining the occurrence of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) in apple and pear orchards was carried out from May to July in the spring of 2007. In total, 50 apple and 36 pear orchards (Figs. 2.1 and 2.2) and genetic resource collections were surveyed, and 870 leaf samples (one sample per tree) were collected from 115 different apple (*Malus domestica* (Suckow) Borkh.) genotypes and 248 samples from 44 different pear (*Pyrus communis* L.) genotypes (Paper I) in Latvia.

Plum orchards were surveyed in May 2008. There were 28 gardens and genetic resource collections which were surveyed (Fig. 2.3) and 654 leaf samples from 92 genotypes collected, mainly from domestic plums (*Prunus domestica* L.), cherry plums (*P. cerasifera* Ehrh.) and hybrids of the *Prunus* genus (Paper II). The samples were taken mainly from orchards which were planted in the 1990s, where introduced varieties are being grown. Leaves were collected from trees showing signs of virus infection and those without symptoms from different cultivars.

Samples were collected in the period from 2008 to 2021 from wild habitats, genetic resource collections and home gardens (in the historical regions of Kurzeme, Zemgale and Vidzeme) to determine the genetic diversity of ACLSV. Overall, 262 samples were collected, of which 216 were from different Rosaceae species, mainly from cultivated apples, pears, plums, apricots, with 46 from wild plants of the genus *Amelanchier*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Malus*, *Prunus* and *Sorbus*. There were also 44 cultivated apple and pear leaf samples from Ukraine (The Institute of Horticulture, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine) (Paper III) included for comparison.

Each sample consisted of ten fully developed leaves collected from the main branches. The samples were placed in plastic bags and kept in a cold box until they were taken to the laboratory, where they were immediately analysed or frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80 °C. The collected leaves from each sample were divided into two lots, where one lot was analysed by ELISA and the other lot by RT-PCR.

#### 2.1.2. Field trial conditions

The growth parameters of ACLSV-infected and virus-negative trees were compared (Paper IV) to study the impact of ACLSV on the growth and yield of apple trees. The research was carried out at the Institute of Horticulture (DI; Lat:

56.6092713 N, Lon: 23.3064627 E) from 2012 to 2020. Two apple cultivars were selected for the study: 'Gita' (origin Latvia) and 'Antonovka' (origin Russia), grafted on virus-free B396 rootstock. Standard planting material (DI) selected from ACLSV-infected and virus-negative trees was used for comparison. Virus-free B396 rootstock was obtained from the "Lodder Unterlagen" nursery (Germany). The virus status of the established trial trees was checked twice by RT-PCR during the evaluation period.

The trial was managed according to a sustainable (integrated) cultivation system, including integrated plant protection. The canopy of the tree was trained by adapting the slender spindle (SS) principle with a planting distance  $1.5 \times 4$  m. The trial was set up with a randomized design, in three replicates, using three trees from virus-negative plants and ACLSV-infected trees, respectively. The trial soil was sod-clay with loam with a pH of KCl 6.6. The content of organic matter was 2.0%, the plant-available phosphorus ( $P_2O_5$ ) and potassium ( $K_2O$ ) – 77 mg  $kg^{-1}$  and 154 mg  $kg^{-1}$ , respectively (by the Egnér-Rím method (Egnér et al., 1960)). Fertilization was carried out based on soil analyses. Nitrogen-containing fertilizer (6  $gm^{-2}$  of N) was provided on the surface of the tree row in the first half of each growing season. Fruit thinning was done mechanically (by hand). The one-meter-wide strips along the rows of trees were sprayed with herbicides, and wood chip mulch was used to preserve soil moisture. The grass that was growing between the rows was mowed several times a season.

### **2.1.3. The establishment and maintenance of candidate plants in the greenhouse**

According to EPPO standard PM 4/27(1) (EPPO, 1999), 26 apple and 16 pear genotypes, including introduced and native varieties and promising hybrids, were selected for sanitation and the establishment of nuclear stock material (Paper V). Plant material for propagation was collected in the genotype collection orchards of the Institute of Horticulture in Dobele and Pūre. Ten apple and ten pear cultivars have been grafted on seedling rootstocks and grown in containers with a sterilized peat substrate and maintained in an insect-proof greenhouse since 2007.

Newly established candidate plants were kept in a heated greenhouse at an ambient temperature not lower than  $-10$  °C to avoid frost damage. The floor of the greenhouse under the containers was covered with 5 cm thick foam blocks during the winter. The containers with the substrate were wrapped in stone wool and the plants were covered with agrotexile (17g/m<sup>2</sup>). Starting from 2014, the containers are insulated with polyethylene bubble film instead of rock wool, and the plants were wrapped in a double layer of agrotexile (density 17g/m<sup>2</sup>).

## **2.2. Virus elimination in candidate plants by thermotherapy**

Two- and one-year old candidate plants were placed in growth chambers KBWF 240, KBWF 270 (Binder GmbH, Germany) and EKOCHL 1500 (Angelantoni Life Science, Italy) in 16 h periods of light and 8 h of darkness, with a humidity level of 75% (Paper V). The applied thermotherapy conditions for apples and pears are summarized in Table 2.1. In 2009, the plants were kept at an elevated temperature for 40 days, as recommended by several authors (Švarcbahs et al., 1977; Lenz & Lankes, 2006). In 2010 and 2011, the duration of thermotherapy was prolonged to 70 days, according to the recommendations of Howell et al. (1998). In the following years, the duration of thermotherapy and the temperature at night were reduced (Table 2.1).

The trees were acclimatized to a 35 °C period of light and a 30 °C period of dark for one week prior to thermotherapy, to reduce the negative effect of thermotherapy on tree viability, as recommended by Welsh & Nyland (1965). The duration of thermotherapy was calculated from the first day, when the temperature was raised to 35 °C. After thermotherapy, the tips of the apple and pear shoots (~5 mm) were cut with a sterile blade and grafted onto virus-free seedling rootstock. The grafted plants were kept under glass containers in a growth chamber at 25 °C to maintain a humidity of 90% – 95%. The containers were removed as soon as three to four new leaves had developed and the plants were then moved to the greenhouse.

## **2.3. Virus diagnostic methods**

### **2.3.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

A commercially available DAS-ELISA diagnostic kit (Bioreba AG, Switzerland), which detects the presence of virus-specific antigens in plant cell sap, was used for the initial screening and diagnosis for ACLSV (Paper I and II). The test was performed according to the manufacturer's recommendations, while the incubation time and temperature were changed. The incubation time was extended from four hours of incubation at +30 °C to 16 hours at +4 °C to increase the sensitivity of the test. Lyophilized plant material supplied by the manufacturer was used as the positive and negative control for each test. The immunoassay absorbance –optical density (OD), was measured at 405/492 nm with an Asys Expert 96 spectrophotometer (Hitech, Austria) after 30 minutes, one hour and two hours of incubation. The 'cut-off' value for positive samples was calculated from the optical density measures according to the formula recommended by the manufacturer (Bioreba AG): cut-off value = (average OD + 3s) × 1.1.



### 2.3.2. RNA extraction and RT-PCR

The collected leaf samples were ground into a fine powder in liquid nitrogen using a pestle and mortar. A commercially available RNeasy Plant Mini Kit reagent set (Qiagen, Germany) was used for total genomic RNA extraction for the apple and pear leaf samples collected in 2007. RNA was isolated following the manufacturer's instructions. An RLT buffer was used for apple leaf tissue lysis, and an RLC buffer for pear leaf tissue. A commercially available Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) was used to extract the total genomic RNA/DNA from leaf samples collected from 2008 to 2021. Isolation of nucleic acids was performed according to the manufacturer's recommendations, with minor changes in the isolation protocol. Approximately 100 mg of leaf sample powder was suspended in 200 µl of TE buffer mixed with 0.8 µl of 99% 2-mercaptoethanol (Roth, Germany). The first centrifugation step was performed at maximum speed (~14000 rpm). Nucleic acid precipitation was performed with ice-cold 96% ethanol and left overnight at -20 °C instead of the 10 minutes specified in the manufacturer's protocol. DNase I (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) was added to the suspension after extraction to obtain RNA without a DNA admixture. The quality and quantity of the extracted RNA was assessed with a NanoDropR ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The isolated RNA was immediately used further for RT-PCR or stored at -80 °C.

An RT-PCR One-Step RT-PCR reagent kit (Qiagen, Germany) was used as a confirmatory diagnostic method, according to the protocol developed by Hassan et al., 2006. Viral genome-specific oligonucleotides primers were used for virus diagnostics in the plants (Menzel et al., 2002; Hassan et al., 2006). The oligonucleotide primer sequences used in the viral diagnostics are shown in Table 2.2. Positive samples from the DAS-ELISA test were used as a positive control for the test. RNase-free water and plant *nad5* gene amplifying oligonucleotide primers were used as the quality control for the reaction.

All RT-PCR steps were performed in an Eppendorf Mastercycler thermal cycler (Eppendorf AG). The final RT-PCR products were determined by electrophoresis on a 2% agarose gel in a TAE buffer, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. The length of the RT-PCR products was determined by comparison with an O'RangeRuler 100bp DNA length fragment marker (Thermo Fisher Scientific, Lithuania).

### 2.3.3. Screening of viruses in candidate plants with woody indicator plants

In 2010, 17 virus-free woody indicator plant genotypes were obtained from the Netherlands Horticulture Inspection Service (Naktuinbouw), which were

grafted on seedling rootstock and maintained under greenhouse conditions. In 2012, the first test for the presence of viruses was performed with the cultivars: 'Ausma', 'Baltais Dzidrais', 'Spartan', 'Liberty', 'Lobo', 'Antei', 'Melba', 'Lobo' and 'Antonovka' (Paper V) to prove the effectiveness of the thermotherapy. The tested (recovered) material and indicator plants were grafted on the seedling rootstock of an 'Antonovka' apple cultivar. The budding was done during the growing season by placing the dormant bud under the rootstock bark, following the methodology described by Kirby et al. (2001), in three replications. The woody indicator plants *Malus platycarpa* (for ACLSV detection), *M. pumila* 'Virginia Crab' (for ASGV and ASPV detection), *M. pumila* 'Lord Lambourne' (for ApMV detection) were used in the work. The indicator plants grafted onto seedling rootstock were used as a negative control. The 'Rubin' apple cultivar, which was previously confirmed to be infected with four viruses by RT-PCR, was used as a positive control. After budding, the plants were maintained in an insect-proof greenhouse with cooling. The maintained temperature range was 18 – 25 °C to ensure an optimal temperature for the expression of symptoms. The budded plants were observed for eight weeks until symptoms appeared. Symptom signs were also assessed at the beginning of the following growing season.

## 2.4. Genetic analysis

### 2.4.1. Sequencing and sequence analysis

From 2008 to 2021, all ACLSV-positive samples collected from genetic resource collections and from the wild-growing *Malus* plants, were re-tested with a second oligonucleotide primer pair (CP1/CP2) that amplifies an 803 bp long fragment of the virus coat protein gene (CP1 5' CAA GAG ART TTC AGT TTG CTC G 3' / CP2 5' AAG TCT ACA GGC TAT TTA TTA TAA GTC TAA 3') (Paper III). The RNA extracted from ACLSV-infected plants was subsequently transcribed into cDNA. A High Capacity cDNA Reverse Transcription reagent kit (Applied Biosystems, USA) with randomized hexamer oligonucleotide primers was used for the synthesis of clonal DNA, according to the manufacturer's protocol. A REDTaq® ReadyMix™ PCR reaction mix (Sigma-Aldrich, Germany) with a CP-specific oligonucleotide pair (CP1/CP2) was used for the amplification of viral coat protein coding sequences, according to the manufacturer's instructions.

PCR products were purified using a GeneJet PCR Purification kit (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) and sequenced in both directions using the same oligonucleotide primers as from the PCR amplification. The sequencing was performed with a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) automated genetic analyser at the Latvian State Forestry Institute "Silava". A

total of 34 full-length ACLSV CP coding sequences obtained from different genotypes and locations were sequenced.

Sequence assembly, quality control and alignment were performed using a LASERGENE 17 software package (DNASTAR Inc., USA). The full-length amplicon sequence (contig) of each isolate was assembled from forward and reverse sequence reads and manually edited in SeqMan Pro 17. Sequence ends were trimmed and aligned to ensure quality. The obtained nucleic acid sequence alignments were translated into amino acid sequences to determine possible open reading frame (ORF) shift errors (stop codons). The obtained sequences were deposited in GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) and are freely available under accession numbers ON641843 – ON641876.

In this study, 29 ACLSV CP gene (ORF3) sequences from apple and pears and five sequences from plums were compared with 282 ACLSV CP sequences from *Malus*, *Cydonia*, *Crataegus* and *Pyrus* and 90 sequences from *Prunus* available in the GenBank database ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). The ACLSV genome region from 6784 to 7365 nt (according to the reference sequence NC\_001409 from GenBank) has been analysed in the work. Sequence alignment was performed using the MAFFT algorithm, and the pairwise identity of nucleic acid and amino acid sequences was determined with the MegAlign Pro program LASERGENE v. 17.

#### **2.4.2. Detection of recombination events and phylogenetic analyses**

Recombination analysis was performed using the recombination detection program RDP v. 5 (Martin et al., 2021), which excluded that the obtained virus sequences were recombinants, with different phylogenetic origin, formed between different ACLSV genotypes or the RNA of another virus that was present in the same plant, and/or with plant RNA. There were 34 obtained sequences and 372 ACLSV CP gene sequences obtained from host plants of the genera *Malus*, *Cydonia*, *Crataegus*, *Pyrus*, and *Prunus* available in the GenBank database (Paper III) analysed in this study. Analyses were performed using default settings, including seven methods: RDP, GENECONV, Chimaera, MaxChi, BootScan, SiScan and 3Seq. Only the recombination events confirmed by at least three of the included methods in RDP5 with  $p \leq 0.05$  were considered significant. The identified putative recombinant sequences were further excluded from phylogenetic analyses.

The sequence data alignments for pome fruit and stone fruit virus isolates were performed separately. The first dataset of the virus sequence alignment included 27 sequences obtained in this study and 276 ACLSV CP nucleotide sequences from pome fruit isolates available in GenBank, whereas the second analysed sequence dataset consisted of stone fruit isolates: five sequences

obtained in this study and 90 homologous sequences from GenBank. The apricot pseudochlorotic leaf spot virus (APCLSV) CP coding sequences AY713380, JN873309, KX768275 and KY310579 were included as an outgroup in both sequence alignments and phylogenetic analyses. Maximum – parsimony analysis was applied in the computer program PAUP (Swofford, 2002) v.4.0a169 (<http://phylosolutions.com/paup-test/>) to reconstruct the phylogenetic relationships among ACLSV isolates. Alignments were subjected to heuristic search with a random addition sequence in 1,000 replicates with the following program settings: the MulTrees option was disabled, the steepest descent method and the tree bisection reconnection (TBR) were enabled. The same settings were used for statistical support (bootstrap) analyses with three random addition sequences in each of 1,000 (bootstrap) replicates.

## **2.5. Statistical analysis of the data**

### **2.5.1. Descriptive statistics**

Descriptive statistics were performed with a basic Excel program for the initial data from the DAS-ELISA test and the RT-PCR. The occurrence of ACLSV was expressed as a percentage of the infected samples out of the number of tested samples. The following was calculated to determine the level of significance between the number of positive and negative cases found in the samples from the cultivars: mean value ( $\mu$ )  $\pm$  standard deviation ( $\sigma$ ). Virus occurrence data were analysed by a Fisher's exact test in a GraphPad Prism computer program (GraphPad Software Inc., USA) to determine the level of significance between two categorical values (at  $p < 0.05$ ), for example, seedling and clonal rootstocks.

### **2.5.2. Processing of tree growth and yield parameters**

The collected data – the tree trunk diameter (20 cm above the grafting union), tree canopy parameters, yield per tree and fruit size were used to calculate productivity, trunk cross-sectional area (TCSA) and cumulative yield efficiency (cumulative yield per TCSA and canopy volume ratio) (Paper IV). The volume of the canopy was calculated according to the formula proposed by I. Dimza (Rubauskis et al., 2012).

Data were processed using SPSS Statistics 25 software. The obtained data were analysed with an analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was calculated for the effect of the main factor (cultivar), the side factor (virus) and the interaction between the two factors. The difference between variables was considered significant at  $p \leq 0.05$ .

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Occurrence of ACLSV in orchards and in the wild

The results obtained revealed that ACLSV is found widely in apple and pear orchards, and most apple and pear cultivars grown in Latvia, as well as some plum cultivars which are infected with it (Paper I and II). In addition, research done previously in Latvia (Švarcbahs & Miltiņš, 1982), using woody indicator plants, showed that many apple and pear cultivars were infected with latent viruses. ACLSV was detected in all the apple orchards tested, 27 out of 36 pear orchards and six out of 28 plum orchards. A significantly higher occurrence of the virus was found in apple orchards in Kurzeme, rather than in other historical regions (Table 3.1). Using DAS-ELISA, ACLSV was detected in only 11.4% of the apple samples tested, 4.8% of pear and 2.6% of plum samples, while ACLSV was detected in 65.4% of apple samples, 32.3% of pear and 2.0% of plum samples with RT-PCR. The occurrence of ACLSV in Latvia is equal to the data for other countries, where the incidence of ACLSV reaches 33 to 100%, if virus-free planting material is not used for the establishment of orchards (Desvignes 1999; Krizbai et al., 2001; Kundu 2003; Kukharchyk 2006). A significantly higher number of positive cases was detected by RT-PCR than by DAS-ELISA, but not all positive samples detected by DAS-ELISA were also confirmed by RT-PCR.

Virus detection methods can significantly affect results as they have varying sensitivity and accuracy. The use of woody indicator plants is controversial, especially when the results are difficult to interpret due to the absence of symptoms (Menzel et al., 2002). The sensitivity of DAS-ELISA can be affected by low virus concentrations in plants during a certain period of the growing season (summer and autumn). The concentration of viruses from the *Trichovirus* genus in plants fluctuates during the growing season and decreases during the summer with increasing environmental temperature (Fuchs et al., 1985). The DAS-ELISA method is considered reliable when young and symptomatic leaves are used as samples (Torrance & Dolby 1984; Desvignes 1999). Diagnostic methods based on nucleic acid analysis are widely used and considered reliable for the detection of viruses (Kirby et al. 2001). During this work, the number of positive samples detected was significantly higher using RT-PCR than DAS-ELISA, although RT-PCR did not confirm all positive ELISA results. This shows that none of the diagnostic methods applied are completely reliable. As pointed out by MacKenzie et al. (1997), despite its high sensitivity and specificity, RT-PCR is affected by many factors, such as RNA purity and the specificity of the oligonucleotides used in the diagnosis, which may affect the performance of the diagnostic test and may give false negative results. In contrast, broad-spectrum polyclonal antibodies cover a wider spectrum of virus genetic diversity, so a

combination of several methods is still desirable for accurate and specific virus detection.

All the samples of the 'Stars' apple cultivar which were tested were infected with ACLSV, and the number of positive cases for several apple cultivars was also significantly over the average level. In contrast, only certain pear cultivars ('Bere Kievskaya' and 'Duhmyanaya') and plums cultivars ('Prune d'Agen' and 'Experimentalfältets Sviskon') showed a significantly higher ACLSV incidence over the average level, while all the tested samples from *Prunus cerasifera* seedlings showed a negative result with both applied methods.

In analysing the occurrence of ACLSV in apple and pear plantations depending on the rootstock type (seedling or clonal rootstock), the apple cultivars grafted on clonal rootstock showed a significantly ( $p = 0.014$ ) higher occurrence of ACLSV than the cultivars grafted on seedling rootstock (Table 3.2).

The high incidence of the virus in apple orchards is related to the impact of clonal rootstock, which was confirmed by the statistical analysis of data. Many local and some introduced apple cultivars from neighbouring countries are also infected with ACLSV. The spread of viruses in orchards has been contributed to by the initial use of infected propagating material from genetic resource collections. Similarly, previous studies have shown that Malling and Malling Merton series clonal rootstock was infected with ACLSV (Šutić et al. 1999). In 1982, Švarcbahs and Miltiņš also reported that 61% of clonal rootstock in Latvia was infected with the latent virus complex. The data obtained confirmed the previous report (Švarcbahs & Miltiņš, 1982) that many native apple cultivars and introduced cultivars, which are still widely grown, are infected with ACLSV. In Latvia, pears are mainly grown on 'Kazraušu' pear rootstock and the occurrence of the virus in pears was much lower compared to apples. Until now, it was considered that the virus could not spread through seeds (Brunt et al. 1996), so the possibility that pear seedling rootstock could be a possible source of infection is unlikely but cannot be completely excluded. Some studies show that ACLSV is present in seeds (Li et al., 2022) and virus vectors may also exist in nature (Šutić et al., 1999). Most pear cultivars have been imported to Latvia from neighbouring countries, such as Belarus, Lithuania, Ukraine, Russia and Estonia, where the certification system for planting material has not yet been established; thus, infected scions are the most likely source of initial infection. The incidence of ACLSV in plum orchards was low compared to apples and pears, however, some plum cultivars showed a higher number of positive cases than others, for example, the Swedish cultivar 'Experimentalfältets Sviskon' and the cultivar 'Prune d'Agen'. This suggests that the original source of material may have already been infected and ACLSV was further spread using this infected propagating material. When testing samples collected from genetic resource collections and from wild Rosaceae plants (Paper III), ACLSV was detected in 79 plant samples of the *Malus*, *Prunus* and *Pyrus* genus.

From the fruit plant genera included in the study, 81% of ACLSV positive samples were from plants of the genus *Malus*. ACLSV was not detected in apricots and in wild *Amelanchier*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Prunus* and *Sorbus* plants. The virus was detected only in cultivated apples, pears, plums and in wild plants of the genus *Malus*, including *M. sylvestris*. This is the first time that ACLSV infection has been detected in *M. sylvestris* plants growing in the wild. Although many crab apple species are considered highly profitable (Mink, 1989), ACLSV infection has previously been laboratory-confirmed only in *M. spectabilis* (Chen et al., 2014). Several *Malus* species and hybrids have been experimentally inoculated with the virus (Campbell, 1962), but cannot be considered as natural hosts.

### 3.2. Recombination analysis of the ACLSV CP gene

Recombination analysis of ACLSV CP gene sequences was performed for 34 virus isolates obtained in this study together with 372 analogous sequences from GenBank (Paper III). The analyses performed revealed eight possible recombination events. Most of the recombination events have been identified in the 5' end of the CP gene. The recombination breakpoints for the six detected recombination cases could not be reliably determined, and, therefore, they could be located in the coding part of the moving protein (MP) gene or in the non-coding region of the genome (3' UTR).

Factors contributing to the recombination may be the presence of different virus genotypes or multiple viruses in the same plant and high virus replication potential (Astier et al., 2007). The part of the ACLSV genome where the MP overlaps with the CP gene is known to be highly variable (Myrta et al., 2011) and may affect the genetic diversity of the virus. The recombination events in this part of the genome have also been identified in previous studies (Rana et al., 2010; Chen et al., 2014; Mažeikiene et al., 2018). All possible recombination events were recognized by at least three detection methods included in the RDP5 program package. Related isolates of the same host plant were identified as recombinant parental sequences, except for sequences KC404877 and KC404872, whereas one of the parental sequences was determined in a pear isolate, and for apple isolate LV27, and parental sequences were identified in pear and peach isolates. All recombination events in the CP gene sequences for the ACLSV isolates obtained in this study were identified in cultivated apple trees and also in the wild growing apple tree (isolate NZ5), which confirms that the recombination process is common in the ACLSV population. Genetic changes in virus populations are ongoing. The main sources of genetic variation are mutations and recombination. Most genetic variation can be lethal or neutral, but in some cases, it can be beneficial in a particular condition (Lemey & Posada, 2009). Sequence comparison, calculation of sequence similarity and construction of phylogenetic trees allow for relatedness to be detected between virus taxa and

isolates and the analysed genetic diversity of a virus population (Choudhuri, 2014). This information allows one to presume the origin and potential routes for the spread of the viruses and provides important information about the epidemiology of the virus.

### 3.3. Genetic diversity of ACLSV

The comparison of ACLSV genome ORF3 region coding CP sequences was performed for 34 ACLSV isolates from *Malus*, *Pyrus* and *Prunus* plants at position 6784 – 7365 nt (according to the ACLSV reference sequence NC\_001409). The identities of the analysed sequences ranged from 79.55 to 98.45% at the nt level and 84.54 to 100% at the aa level among the ACLSV isolates obtained in this study and from 66.49 to 99.14% at the nt level and from 68.04 to 100% at the aa level compared to the 374 homologous ACLSV sequences available in GenBank. The identity of CP gene sequences of Latvian ACLSV isolates (79.55 to 98.45% at the nt level and 84.54 to 100% at the aa level) could be considered variable, but it did not exceed the expected species demarcation criteria in the *Betaflexiviridae* family – 72% nt identity or 80% aa identity between the respective CP genes sequences (Kreuze et al., 2011). However, some of the apple and pear isolates obtained in this study had 100% identity at the amino acid level with other GenBank sequences, indicating the important role of planting material in the spread of ACLSV, especially over long distances (Mink, 1989). The LV54 apple isolate showed the highest identity at the nt level (99.14%) with the isolate from Brazil (KX668485) and 100% identity at the aa level with another apple isolate LV44 obtained in this study and with 22 other apple isolates from GenBank (from Brazil, China, Canada, Ethiopia, Iran and Lithuania). The LV81 pear isolate showed 100% identity at the aa level with two apple isolates from Germany (KX579123) and China (MH534897). The lowest identity at the nt level (66.49%) was found for the LV07 apple isolate with the peach isolate from China (JN849004), while the lowest identity (68.04%) at the aa level was found between two peach isolates from China (JN849007) and Canada (MZ126485). All sequences, including isolates from Latvia and other parts of the world, were divided into nine groups according to their host plants (Paper III) to analyse the genetic diversity of ACLSV. ACLSV isolates from apricots (94.5% nt and 98.97% aa sequence identity) formed a very homogeneous group. The greatest variability of ACLSV coat protein gene sequences was observed for peach isolates, for which 68.04% – 100% identity was found at the nt level and 71.13 – 100% identity at the aa level. The lowest identity was observed between groups of apple and peach isolates, which had 66.49% – 100% identity at the nt level and 68.04% – 100% at the aa level. As the virus is easily propagated by vegetative propagation – by root cuttings, grafting and budding (Šutić et al., 1999), newly formed plants can accumulate several genetic variants of the virus, and even four different genotypes of the



virus can be found in a single apple tree (Chen et al., 2014), which may contribute to the formation of distinct genetic variants of the virus.

The high variability present between isolates from different woody plant groups, and at the same time the presence of identical nucleotide sequences between plant isolates from different genera obtained from wild or cultivated plants, points to uncertainties about the routes of virus transmission between different plant groups (e.g., *Malus* and *Prunus*). Vegetative propagation between these plant groups does not usually occur in agricultural practice. ACLSV has been found to spread naturally in the field, but none of the studied potential virus vectors: nematodes of the genus *Eudosylaimoid*, peach aphids (*Myzus persicae*) or pollen have been confirmed experimentally (Mink, 1993; Šutić, 1999). Recently, Li et al. (2022) identified ACLSV in the seeds and seedlings of infected *Pyrus betulifolia* and *P. calleryana* fruits, demonstrating that the virus can also be transmitted by seeds. ACLSV has also previously been detected in apple and quince seedlings (Posnette & Cropley, 1964), as well as in hawthorn and blackthorn seedlings grown in hedgerows in the United Kingdom (Sweet, 1980). Mazeikiene et al. (2018) reported that ACLSV is also present in old apple tree seedlings. In this study, ACLSV was detected in seedlings of cultivated apple trees and in wild *M. sylvestris* trees, indicating possible seed transmission of the virus. Certain viruses of the genus *Trichovirus* are transmitted by mites. For example, cherry mottle virus (CMLV) is transmitted by the mite *Eriophyes inaequalis* and peach mosaic virus (PcMV) is transmitted by *Eriophyes insidiosus* (Kreuze et al., 2011). Several mite species of the genus *Eriophyes* also colonize apple trees, pears, and plums. Most of these mites are monophagous, with the exception of *Eriophyes pyri*, which is polyphagous and lives in the spongy parenchyma of *Malinae* plants (Skoracka et al., 2005). Although the role of *Eriophyes* mites in the transmission of ACLSV must be experimentally proved, the existence of any ACLSV invertebrate vector is still in doubt.

### 3.4. ACLSV phylogeny and genetic types

Sequences of the ACLSV CP gene (nt 6781 – 7362) were used to elucidate the genetic relatedness of ACLSV isolates from different host plants and geographic regions (Paper III). Analyses of ACLSV isolates from *Malinae* subtribe plants included 303 virus isolates from *Malus*, *Crataegus*, *Cydonia* and *Pyrus* species. ACLSV sequences are divided into two large clusters (Cluster I and II). The first main cluster consisted of two subclusters (subcluster IA and IB), in which the clustering of ACLSV sequences was not related to their geographic origin or host plants. Amino acid sequence analysis showed that subcluster IA differs from subcluster IB and cluster II at seven positions. Subcluster IA has amino acid covariations: Ala<sup>40</sup>-Val<sup>59</sup>-Phe<sup>75</sup>-Ile<sup>86</sup>-Ser<sup>130</sup>-Gly<sup>137</sup>-Met<sup>184</sup>, while subcluster IB has amino acid covariations: Ser<sup>40</sup>-Leu<sup>59</sup>-Tyr<sup>75</sup>-Ala<sup>86</sup>-Thr<sup>130</sup>-Ser<sup>137</sup>-Leu<sup>184</sup>. In addition, cluster II differs from both subclusters IA and

IB at two amino acid positions: 73 and 79, with Ser instead of Gly (Paper III). All Latvian isolates were evenly distributed in both IA and IB subclusters. The IA subcluster consisted of two parts (IA1 and IA2) and included five Latvian ACLSV isolates from cultivated apple (*Malus domestica*) and one isolate from wild *M. sylvestris* (NZ48), as well as one isolate from cultivated pear (LV81) together with the type isolate P205 (D14996) from Japan and 79 other sequences from cultivated apple trees obtained from GenBank (Fig. 3.1).

Subcluster IB contained four Latvian ACLSV isolates from cultivated pears, including an isolate from Ukraine and 16 isolates from cultivated and wild apple trees obtained in this study together with a B6 type isolate (AB326224) from Japan and 151 other sequences from cultivated pome fruits obtained from the GenBank database (Fig. 3.2).

Seventeen isolates from *P. pyrifolia* (GU327984 – GU328004) formed a distinct group in subcluster IB (IB2) with high statistical support, differing from other pome fruit isolates by two amino acids Ile<sup>80</sup> and Ser<sup>188</sup>. Cluster II included the MO5 type isolate (AB326225) together with 43 sequences from GenBank obtained from different hosts - cultivated apples and crab apple *M. spectabilis*, cultivated pears *Pyrus communis* and other *Pyrus* species (*P. pyrifolia*, *P. bretschneideri*, *P. betulifolia*, *P. calleryana*) and *Crataegus pinnatifida*. Most of these isolates come from China, while there are two from Japan and Taiwan. Phylogenetic reconstruction of ACLSV isolates from host plants of subtribe *Malinae* suggests that there are at least three ACLSV genetic types, B6, P205 and MO5 (Yaegashi et al., 2007; Chen et al., 2014). Phylogenetic studies revealed that all the analysed Latvian ACLSV isolates from pome fruits belong to two genetic types (B6 and P205), which are also common in the wild. The B6 and P205 virus genotypes are distributed worldwide and may have spread via infected planting material, mainly Malling (M) and Malling-Merton (MM) series clonal rootstock (Šutić et al., 1999). The MO5 genetic type differed from B6 by only two amino acid positions and was found in *Malus*, *Pyrus* and *Crataegus* plants in China.

Phylogenetic analysis of virus isolates from host plants of the tribe *Amygdaleae* (*Prunus domestica*, *P. armeniaca*, *P. avium*, *P. cerasoides*, *P. domestica*, *P. dulcis*, *P. persica* and *P. salicina*) divided sequences into two large clusters (Cluster I and II) with high statistical support (Paper III). The first large cluster consisted of three subclusters (subclusters IA, IB and IC). As with pome fruit isolates, subgrouping was not related to geographic origin or host plants. In subcluster IB, ten isolates from *Prunus avium* together with four sequences of ACLSV isolates from *P. cerasoides*, *P. persica*, *P. domestica* and *P. salicina* formed a distinct subgroup (IB1) with high statistical support that differed from subcluster IA (42 sequences), at seven amino acid sequence positions from subcluster IB (eight sequences), subcluster IC (five sequences) and cluster II (25 sequences): Ala<sup>40</sup>-Val<sup>59</sup>-Phe<sup>75</sup>-Ile<sup>86</sup>-Ser<sup>130</sup>-Gly<sup>137</sup>-Met<sup>184</sup>. Whereas amino acid covariations: Ser<sup>40</sup>-Leu<sup>59</sup>-Tyr<sup>75</sup>-Ala<sup>86</sup>-Thr<sup>130</sup>-Ser<sup>137</sup>-Leu<sup>184</sup> were observed in

subcluster IA, for eight sequences from subcluster IB and five sequences from subcluster IC. Subcluster IC differed from subclusters IA and IB by three amino acids: Ser<sup>14</sup>-Asn<sup>24</sup>-Leu<sup>72</sup>.

Cluster II consisted of 25 ACLSV sequences from China, isolated from peaches (*Prunus persica*). All sequences in cluster II differed from cluster I by four from the seven amino acid positions mentioned above (Paper III) and additionally by twenty-six amino acid positions. All Latvian ACLSV isolates from *Prunus domestica* were grouped into subclusters IA and IC (Fig. 3.3). Three Latvian ACLSV isolates (PD34, PD36 and PD44) together with 39 other virus sequences from cultivated *Prunus domestica*, *P. persica* and *P. salicina* plants were grouped in the IA subcluster. The other two Latvian ACLSV isolates from plums (PD166 and PD325), together with three virus isolates from *P. domestica* (type isolate P863; NC\_001409) and *P. persica* (HQ398252, MZ126481) formed subcluster IC with high statistical support (Fig. 3.3.). Phylogenetic reconstruction of ACLSV isolates from host plants of the tribe *Amygdaleae* in this study indicated that at least four genetic types of ACLSV exist. The B6 and P205 types were previously defined by Yaegashi et al., 2007 using five amino acid co-variations (Ala<sup>40</sup>-Val<sup>59</sup>-Phe<sup>75</sup>-Ser<sup>130</sup>-Met<sup>184</sup> or Ser<sup>40</sup>-Leu<sup>59</sup>-Tyr<sup>75</sup>-Thr<sup>130</sup>-Leu<sup>184</sup>). In this study, P863 was recognized as a distinct genetic type based on a previously identified strain P863 (German et al., 1990) associated with bark split disease in *P. domestica* plants. Type P863 was defined based on five ACLSV sequences that formed a highly supported phylogenetic lineage and shared the same amino acid covariation as type B6 with three amino acid substitutions in the virus coat protein: Ser<sup>14</sup>-Asn<sup>23</sup>-Leu<sup>72</sup>. Ta Tao 5 (Marini et al., 2008) is the most distinct group of virus isolates from other ACLSV isolates. It exceeds the species demarcation criteria defined for *Betaflexiviridae* and most likely represents a new viral species, as previously suggested by Zhou et al. (2018). The lowest CP sequence identity of Ta Tao type 5 was with *Malus* isolates (66.5% nucleotide sequence identity and 68% amino acid identity), and there were more than 25 amino acid substitutions in the entire CP gene. However, Ta Tao type 5 isolates had the same amino acid substitutions at Ser<sup>40</sup> and Tyr<sup>75</sup> as B6 type isolates, indicating that these amino acid combinations are essential for efficient replication in the host plant, not only for ACLSV (Yaegashi et al., 2007) but also for other *Trichoviruses*.

Phylogenetic analyses of virus isolates from different host plants - almonds, apricots, apples, peaches, pears, plums and hawthorns showed that sequence grouping is not related to either their geographical origin or their host plants. The B6 and P205 genotypes are present in both pome fruit and stone fruit virus isolates, indicating their common origin and the possibility that an unknown virus vector exists in nature, or a virus vector had previously existed that spread the virus among different plants of the Rosaceae family. A defective virus genome may also have been propagated and distributed due to the rapid development of the fruit growing industry and intensive vegetative propagation

of plant material. The sequence of the virus has changed during the process of evolution, and its compatibility with the vector has also changed, so the virus may have lost its ability to spread through the vector.

### **3.5. Impact of ACLSV on yield and vegetative growth**

The experiment was arranged according to the principle of randomized blocks in three repetitions. Each of the blocks consisted of three ACLSV-infected and three virus-negative trees from each cultivar (Paper IV). In total, 18 trees from each cultivar. During the trial, trees were visually checked for virus symptoms: chlorotic rings and arches on leaves or rusty rings on fruits. No signs of viral infection were observed throughout the trial period. All trees were initially tested for the presence of ApMV, ACLSV, ASGV and ASPV by RT-PCR. The second test was repeated at the end of the trial. Trees with the same test results were selected for data analysis: nine ACLSV-infected and six virus-negative trees for the ‘Antonovka’ cultivar and three virus-infected and 14 virus-negative trees for the ‘Gita’ cultivar. Statistical analyses were performed with SPSS, taking into account the unequal sample size for each factor.

Apple chlorotic leaf spot virus particles accumulate in the phloem and parenchyma cells of leaves and roots, affecting the flow of sugars throughout the plant, which can adversely affect plant growth and yield (Kreuze et al., 2011). A statistically significant negative impact from ACLSV on plant yield was not observed during the eight seasons (2013 – 2020) for both cultivars. In general, the effect of virus infection on a tree depends on both the cultivar and the rootstock (Posnette, 1989). The B396 rootstock used in this study was derived from red-leaved paradise apple (B9), which is considered to be tolerant to latent virus infection (Cummin & Aldwinckle, 1983). Therefore, no statistically significant negative effect was detected ( $p = 0.13$ ) on apple growth and yield from ACLSV. Statistical analysis of the data indicates a relatively high statistically significant interaction of factors ( $p = 0.06$ ), so the total yield over eight years for the cultivar ‘Antonovka’ virus-negative trees was higher than for virus-infected trees (respectively 52.3 kg and 50.6 kg), but the total yield during the eight years for the ACSV-infected trees of the cultivar ‘Gita’ were higher than for virus-negative trees (101.1 kg and 86.4 kg, respectively). Among both cultivars with a significantly higher yield (1.8 times) exceeded the cultivar ‘Gita’ ( $p < 0.01$ ; (4.70781 E-11)). A lower yield per tree was observed periodically (in 2013, 2014, 2016 and 2020) from ACLSV-infected trees of the cultivar ‘Antonovka’, than for virus-negative trees (Fig. 3.4).

ACLSV-infected trees of the cultivar ‘Gita’ had a higher yield per tree during the entire trial, except in 2016 (Fig. 3.5), when a higher yield per tree (kg) was found in virus-negative trees (27.7 kg and 24.9 kg, respectively).

A statistically significant difference ( $p = 0.02$ ) was found in the yield amount from one tree in 2018, between ACLSV-infected and virus-negative trees, when

a significantly higher yield from ACLSV-infected trees was observed for both cultivars.

There is no data on the response of cultivars 'Antonovka', 'Gita' and the rootstock B396 to latent virus infection. According to the literature, all commercial cultivars and rootstocks from the East Malling and Malling Merton series are considered resistant to latent virus infection (Mink, 1989). Previous studies in England ('Cox's Orange Pippin', 'Golden Delicious', 'Discovery' and 'Laxton's Superb' on rootstock MM106) and the Netherlands ('Golden Delicious' on M26) demonstrated that infection with latent viruses (ACLSV, ASPV and ASGV) can reduce the size of the tree by about a third, but yield efficiency is not proportionally reduced (Meijneke et al. 1973; Cummins et al. 1979; Campbell, 1980). However, studies in the USA ('Idared', 'Delicious' and 'Golden Delicious' on M26, MM102, MM106 and MM111) did not prove that latent virus infection is able to reduce growth or yield (Cummins & Aldwinckle, 1983), which is also consistent with the results obtained in this study.

The presence of ACLSV in plants did not also show a statistically significant negative impact on fruit weight, although virus-negative trees for both cultivars periodically produced larger fruit than ACLSV-infected trees. The average fruit weight of the cultivar 'Antonovka' was higher for ACLSV-negative trees than the virus-infected trees (218g and 209g, respectively), while the average fruit weight of the cultivar 'Gita' was higher from the infected trees than from the virus-negative trees (206g and 186g, respectively). Mean fruit weight varied between years and a statistically significant difference ( $p = 0.04$ ) was observed in the first year when ACLSV-infected trees produced larger fruit than virus-negative trees for both cultivars. A significant difference in average fruit weight (interaction  $p$ -value 0.03) between ACLSV-infected and virus-negative trees was observed for the cultivar 'Gita' in the eighth year after planting, when the average fruit weight was higher for ACLSV-infected trees than for virus-negative trees.

Calculated growth parameters showed little difference between ACLSV-infected and virus-negative trees. The trunk cross-sectional area (TCSA) ratio of virus-negative and ACLSV-infected trees did not differ significantly at planting time, but after eight years, a statistically non-significantly greater increase was observed for virus-negative trees than for ACLSV-infected trees ( $p = 0.80$ ). A significantly higher tree canopy volume was found for trees infected with ACLSV ( $p = 0.01$ ). A statistically insignificant higher cumulative yield efficiency (cumulative yield per TCSA) was observed for ACLSV-infected trees ( $p = 0.81$ ). A higher amount of cumulative yield (kg) per canopy volume ( $m^3$ ) was found for virus-negative trees ( $p = 0.07$ ).

In this study, the data obtained on the impact of ACLSV on the cultivar 'Gita' contradicted previous studies that proved that viruses had a negative effect on the yield and growth of apple trees (Šutić et al., 1999). It is possible that the small number of ACLSV-infected trees from the cultivar 'Gita' (three trees) used in this trial could have affected the accuracy of the collected data. The trial was initially

planned with nine ACLSV-infected and virus-negative trees, but according to the RT-PCR test results, many trees from the cultivar 'Gita' were virus-negative, and many grafted plants from the ACLSV-infected mother plant did not grow due to graft incompatibility caused by ACLSV (Mink, 1989). In addition, setting up the trial from selected virus-negative plants instead of virus-free plants which passed through thermotherapy could have affected the yield and growth parameters in the experiment. A similar observation was obtained in a study comparing M9 rootstock after thermotherapy with virus-negative M26 rootstock, where the cumulative yield per trunk cross-sectional area was higher in trees grafted onto virus-free rootstock after thermotherapy (Koike et al., 1993). Therefore, the fact that there is another unidentified latent virus in the virus-negative trees of the cultivar 'Gita', which reduced vegetative growth and yield cannot be excluded.

### **3.6. Possibilities for ACLSV elimination and the effectiveness of thermotherapy**

Elevated ambient temperatures are widely used to eliminate viruses in plants, including apple trees (Welsh & Nyland, 1965; Lenz & Lanke, 2006). High temperature inhibits virus replication and movement in plant tissues, so thermotherapy can significantly improve the efficiency of virus elimination (Mink et al., 1998). However, temperature and exposure time are limited due to the different tolerance of plant species and genotypes to elevated temperatures (Stein et al., 1991). During thermotherapy, the survival of apple trees ranged from 45 to 100% depending on the thermotherapy conditions and the plant genotype (Paper V). The number of plants that survived thermotherapy to the next season ranged from 12% to 62%. After thermotherapy, most of the plants from candidate material 1/2007/2009 and 2/2008/2010 did not survive to the next growing season; the remaining plants showed reduced vitality and died in the next growing season. When the duration of heat treatment was reduced to 40 days and the adaptation period was extended to seven days, the number of surviving plants after heat treatment increased and they also overwintered successfully (candidate material 5/2012/2013). Although pears are considered to be more sensitive to prolonged high temperatures than other tree species (Papstein et al., 2009), pears survived thermotherapy better than apple trees in this study, and 71% – 100% of pear plants survived. The main problem was the low survival rate of plants after thermotherapy, because the young shoots of some plants did not overgrow, so most of the candidate pear plants were lost after overwintering. The number of overwintered plants for the next season varied from 0% to 36%, and only plants from candidate material 4/2010/2012 and 5/2012/2013 overwintered for several seasons.

Mother plants were selected from apple genetic resource collections or field trials. Only some local apple cultivars like 'Zane', 'Baiba', 'Gita', 'Edīte', 'Roberts',

'Ligita', 'Dace' and 'Uldis', created at the Institute of Horticulture in recent national breeding programs, were virus-free or with a single virus infection. Many mother plants of tested apple cultivars were infected with two or three viruses. The mother plants of some apple cultivars, such as 'Rubin' and 'Ausma', were infected with four tested viruses. In the tested mother plants of pear cultivars, a single virus infection or no viruses were detected. Viruses were not detected in the grafted plants of candidate material 1/2007/2009 in the years following thermotherapy. However, ASGV was detected in the second season after thermotherapy in the apple cultivar 'Sinap Orlovskii', while ACLSV was successfully eliminated in the pear cultivar 'Condo'. By extending the duration of thermotherapy, ACLSV could be effectively eliminated in the cultivar 'Sinap Orlovskii' (candidate material 2/2008/2010), which was infected with several viruses, but ACLSV and ASPV could still be detected in the trees of the cultivar 'Auksis'. The cultivar 'Ausma' (candidate material 3/2009/2011), which had a three-virus infection, remained infected with ASGV and ASPV after thermotherapy. Whereas pears infected with several latent viruses did not survive during thermotherapy.

In order to increase the number of surviving plants after thermotherapy, the duration of thermotherapy was reduced from 70 days to 40 for candidate material 4/2010/2012. After thermotherapy, ACLSV could be detected in some plants in apple cultivar 'Dace' and 'Zarya Alatau', but the latent viruses were successfully eliminated in pears 'Mlievskaya Rannaya' and 'Mramornaya'. The duration of thermotherapy was shortened to 40 days and the temperature during the dark period was decreased to 30 °C (candidate material 5/2012/2013) to improve plant vitality and promote faster growth of new shoots. Newly formed plants, after shoot tip grafting, were tested for the next three seasons after thermotherapy by RT-PCR. ACLSV and ApMV were successfully eliminated from infected apple and pear plants, however, like in previous years, some apple and pear plants remained infected with ASGV or ASPV.

The effectiveness of thermotherapy depends on the sensitivity of viruses to elevated temperature (Campbell & Best, 1968), and the result obtained influenced the reliability of the diagnostic method used, and whether it was sensitive enough to detect the viruses at a low concentration. RT-PCR is considered as the most reliable and sensitive method of the methods used to detect virus infections (Reed & Foster, 2011). However, the efficiency of RT-PCR depends on the quality of the extracted RNA, as high amounts of polyphenolic compounds and polysaccharides in fruit tree leaves can inhibit RT-PCR (MacKenzie et al., 1997; Deng et al., 2004). Therefore, plant RNA *Nad5* gene primers are recommended for use as an internal control to check the quality of the PCR, which is especially important in cases of a negative result (Menzel et al., 2002). After thermotherapy, there is usually a long latent period when viruses may not be detectable due to low virus concentrations in plants (Leonhardt et al., 1998). This could be observed in the study for apple varieties

'Sinap Orlovskii' (candidate material A1/2007/2009) and 'Auksis' (A5/2012/2013), and for the pear cultivar 'Jumurda' (P5/2012/2013). RT-PCR test results were negative in the first years after thermotherapy, but ASPV and ASGV infection was detected only in the third year by RT-PCR, when the virus concentration in plant tissue had reached a detectable level.

Some apple candidate plants from the cultivars 'Dace', 'Rubin' and 'Zarya Alatau' remained infected after thermotherapy and the test results were already positive in the first year of testing. The effectiveness of thermotherapy depends not only on the virus and the thermotherapy conditions, but also on the interaction between the virus and the specific plant genotype (Papstein et al. 2008). Although ACLSV is relatively easy to eliminate from fruit trees with a short period of thermotherapy (Campbell & Best, 1964), apple cultivars 'Zarya Alatau' and 'Dace' remained infected with ACLSV even after 60 days of exposure to elevated temperatures. ASGV and ASPV replicate in the plant cambium and are unevenly distributed in plant tissues, making these viruses more complicated to eliminate and difficult to detect (Desvignes, 1999; Gugerli & Ramel, 2003). Multi-virus infection in plants, especially with ASGV, is more difficult to eliminate (Laimer & Barba, 2011), because ASGV is considered a stable virus, and increased temperature does not sufficiently suppress the replication and further spread of this virus in the plant (Knapp et al., 1995). After thermotherapy, the tested plants with RT-PCR showed the presence of ASGV and ASPV infection in the apple cultivars 'Ausma', 'Baltais Dzidrais', 'Liberty', and 'Rubin', but in later years, no viruses were detected in these plants, because the maintenance of the plants in greenhouse conditions can also affect the uneven distribution of viruses in plants and they are more difficult to detect. The wide spread of fruit tree viruses in Latvia has been facilitated by the propagation of infected clonal rootstock and infected mother trees. Therefore, the selection of mother trees free of virus infections in orchards for the development of candidate material in this study was not possible. Many cultivars were infected with at least two viruses and remained infected even after 60-70 days of thermotherapy. ACLSV in mixed infections is tolerant to elevated temperature (Knapp et al., 1995), which was observed in apple cultivars 'Dace' and 'Zarya Alatau', where ACLSV was not eliminated. Although no impact from mixed virus infections on the elimination of ACLSV was observed for other cultivars, it is possible that the interaction between the virus and the specific plant genotype may also affect the effectiveness of the elimination of the virus. ApMV was detected in apple and pear mother plants before thermotherapy and in some plants, it persisted even after thermotherapy, although ApMV is not thermostable and, if it is not in combination with other viruses, can disappear over the years without thermotherapy (Laimer & Barba 2011).

Individual plants from nine apple cultivars (candidate material 3/2009/2011) that were negative to all viruses tested by RT-PCR, were further tested by the woody indicator plant test for the presence of four viruses (ApMV, ACLSV,



ASGV and ASPV) (Paper V). After eight weeks, none of the tested candidate plants showed symptoms typical for virus infection. However, chlorotic rings on the leaves, characteristic of ACLSV infection, could be observed on *Malus platycarpa* plants two weeks after budding with the cultivar 'Rubin', which was used in the test as a positive control (Fig. 3.6.A). On the other hand, necrotic grooves could be observed in the wood of *Malus pumila* 'Virginia Crab' at the inoculation site, which indicated ASGV infection (Fig. 3.6.B). Negative control plants from *M. platycarpa* and *M. pumila* 'Virginia Crab' did not show these symptoms and remained free of any signs of virus infection. ApMV and ASPV symptoms were not observed on the woody indicator plants that had been used as the positive control (cultivar 'Rubin').

There were 63 plants from 24 apple cultivars and nine plants from six pear cultivars from the recovered 72 apple and ten pear candidate plants, which showed negative RT-PCR results for ApMV, ACLSV, ASGV and ASPV several years after thermotherapy. These plants may qualify as virus-tested mother plants. The candidate plants require testing with woody indicator plants under field conditions to confirm virus-free status, as symptom development usually takes 2-3 years and up to five years to assess symptoms (Panattoni et al., 2013). It takes more than ten years to produce fruit trees plants that qualify as virus-free material (Van der Berg, 2003; Rowhani et al., 2005; Lenz & Lankes, 2006). This is mainly due to the long time required for tree propagation, repeated thermotherapy and testing with woody indicator plants to confirm the virus-free status of candidate plants. In the study, the main reason for the low number of obtained candidate plants was multiple virus infection in mother trees and reduced plant vitality after thermotherapy, resulting in the death of many recovered plants after thermotherapy.

## CONCLUSIONS

1. ACLSV is widely found throughout the territory of Latvia (occurrence in apple orchards reaches up to 65.4%, in pear orchards up to 32.3%, and in plum orchards up to 2.0%). The occurrence of ACLSV in Latvia is similar to other countries, where it reaches 33 to 100%, if virus-free planting material is not used in orchard development. ACLSV occurrence is significantly higher in apple orchards where clonal rootstock is used. A high number of positive cases were found in several apple cultivars, indicating the propagation and circulation of infected planting material (grafts and rootstock) that has contributed to the spread of the virus in orchards, and confirmed previous studies that many native and introduced apple cultivars and rootstock are infected with ACLSV.
2. The phylogenetic reconstruction of ACLSV CP gene sequences obtained from the subtribe *Malinae* and tribe *Amygdaleae* host plant isolates showed that three genetic types of ACLSV are common in Latvia: B6 and P205, which are found in apple trees, pears, and plums, while type P863 is found only in plums. This demonstrates the distinct origins of the virus genetic types, showing that pome fruit and stone fruit virus isolates share a common origin, which indicated the possible existence of a vector in nature.
3. In the study, it was concluded under field conditions, using virus-negative and ACLSV-infected plants, that apple chlorotic leaf spot virus does not have a statistically significant impact on the yield of the apple cultivar 'Antonovka' and 'Gita' or an increase in the cross-sectional area. In the study, it was found that the canopy volume increases significantly for ACLSV-infected trees, but it does not have a significant impact on the ratio of the cumulative yield per canopy volume.
4. The study showed that thermotherapy can also be effective in the case of several viral infections. The interaction between the virus and the specific plant genotype, the tolerance of the plant genotype to increased environmental temperature and plant regeneration capacity influences the effectiveness of thermotherapy.

## RECOMMENDATIONS

1. With respect to the high prevalence of viruses in orchards and genetic resources collections, monitoring of genetic resources must be carried out to limit the further spread of viruses in orchards, while virus-negative mother plants must be used for propagation. This would ensure that high-quality planting material will be used for the establishment of new orchards.
2. Taking into account the occurrence of ACLSV in wild apple trees, further studies should be carried out to prove hypothetical virus transmission pathways, focusing on possible invertebrate vectors and the potential spread of viruses through infected seeds.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

First, I would like to thank supervisors Inga Moročko-Bičevska and Ināra Turka for their support, advice, and motivation during the writing of manuscripts and the entire doctoral thesis, and colleagues at the Institute of Horticulture for the support provided during the writing of the thesis. Special thanks to Edīte Kaufmane for the opportunity, support, general advice, and trust. I express my gratitude to other colleagues at the Institute of Horticulture for their help during the writing process. Many thanks to my family, especially my parents, who gave me the opportunity to finish what I had started. Special thanks to Uldis Verners Brūns for editing of the English text.

Thanks to ESF Project No. 8.2.2.0/20/I/001 "Transition of LLU to the New Doctoral Funding Model", the funding provided the opportunity to realize a part of this research.