

Diagnostyka

American plum line pattern ilarvirus

Zakres

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *American plum line pattern ilarvirus*.

Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzony w 2005-09.

Wprowadzenie

American plum line pattern virus (APLPV) jest najmniej opisanym ilarwirusem porażającym pestkowce. Wirus infekuje pestkowce, w szczególności śliwę japońską, brzoskwinie i kwitnące wiśnie, wywołując wyraźne symptomy. Wcześniej zauważono możliwość przenoszenia wirusa z sokiem oraz poprzez szczepienie (Kirkpatrick *et al.*, 1964; Paulsen & Fulton, 1968; Fulton, 1984). Wykrywanie testem ELISA opisane zostało przez Fultona (1982). W roku 2001 Scott i Zimmerman podali pełną sekwencję genomu północno-amerykańskiego szczepu APLPV oraz jego wykrywanie metodami: molekularną hybrydyzacją i RT-PCR. Dodatkowe informacje na temat wykrywania APLPV były także przedstawione przez Alayasa *et al.* (2003) i Al Rwahnih *et al.* (2004). Ostatnio przygotowane zostało równoczesne wykrywanie ośmiu wirusów drzew pestkowych, w tym APLPV metodą one-step RT-PCR (Sánchez-Navarro *et al.*, 2005).

APLPV jest wirusem z RNA pozytywnego sensu oraz trzyczęściowym genomem. Posiada cztery quasi-izometryczne części o średnicy 26, 28, 31 i 33 nm. Udowodniono, iż wirus jest rozprzestrzeniany jedynie z materiałem rozmnożeniowym. Zsekwenjonowano kilka izolatów APLPV pochodzących z obszaru Morza Śródziemnego, ich analiza porównawcza ujawniła niskie zróżnicowanie genetyczne w obrębie płaszcza i ruchomych białek, podobnie jak wśród izolatów amerykańskich (Myrta *et al.*, 2002; Herranz *et al.*, 2003).

Tożsamość

Nazwa: *American plum line pattern ilarvirus*

Synonimy: plum line pattern virus, peach line pattern virosis virus, Plum American line pattern virus, prunus virus 10

Skrót: APLPV

Taksonomiczna pozycja: Wirusy, Bromoviridae, Ilarwirusy

Kod EPPO: APLPV0

Kategoria fitosanitarna: lista EPPO A1 nr 28, EU Annex: I/A1 – jako Plum line pattern virus (American)

Wykrywanie

Drzewa pestkowe zainfekowane APLPV zazwyczaj wykazują wyraźne objawy zmieniające się sezonowo, dlatego też wizualna inspekcja ma praktyczne znaczenie. Jednak podobne objawy na materiale *Prunus* spp. mogą być także powodowane przez inne ilarwirusy np. *Apple mosaic ilarvirus* (ApMV) i *Prunus necrotic ringspot ilarvirus* (PNRSV). Ponadto, niektóre odmiany roślin żywicielskich nie wykazują jawnych objawów. Zatem wymagane są laboratoryjne badania w celu niedwuznacznej identyfikacji wirusa.

Objawy

Na śliwie japońskiej są to regularne sekwencje wzorów, początkowo tworzące chlorotyczne pierścienie (Web Rys. 1a), wzory w kształcie liścia dębu (Web Rys. 1b) i wreszcie pasmowate żółknięcie żyłek. Wczesnym latem żółte wzory bledną do białokremowych (Web Rys. 1c). W innych przypadkach brzegi blaszki liściowej początkowo są chlorotyczne, a następnie stają się złote (Web zdj. 2). Symptomy nie zanikają podczas gorących pór, jednak nowe liście wschodzące podczas tego okresu są pozbawione objawów.

Na brzoskwiniach wiosną i wczesnym latem są to drobne nieregularne, jasnozielone, faliste pasma po obu stronach głównego nerwu liścia. Tworzą one symetryczne lub przerywane i ponownie łączące się wzory o różnych kształtach. Niektóre liście rozwijają sieć drobnych linii lub siatkę złotawych wzorów, drobne zlewające się pierścienie, pasiastość nerwów lub wzory w kształcie liścia dębu. Objawy zwykle zanikają w okresie lata.

Na *P. serrulata* występują obszary o różnorodnej postaci wybarwione na białe, żółte lub różowe, niekiedy większe pierścienie, lecz znacznie częściej wzory w kształcie liścia dębu. Brzegi blaszki liściowej są jasne, chlorotyczne do wyraźnie złotawych lub białych.

Identyfikacja

Próbobranie

Na wiosnę lepszym źródłem wirusa są liście, aniżeli kwiaty i tkanki korowe, natomiast latem dojrzałe owoce, niż liście. Do testów wykonywanych zimą najbardziej wiarygodnym źródłem tkanek są uspione pączki. Jeśli typowe objawy występują na liściach, należy pobierać liście z symptomami. Jeśli drzewo nie wykazuje cech porażenia, liście należy pobierać z różnych części korony. Podczas próbobrania wiosną rozmieszczenie liści na jednorocznych pędach wydaje się nie mieć wpływu na wykrywanie wirusa. W okresie wysokich temperatur podstawa dojrzałego liścia jest nieco lepszym źródłem wirusa, niż jego środkowa, czy wierzchołkowa część. Próbkę liści, tak samo jak w przypadku innych ilarwirusów drzew pestkowych, mogą być przechowywane w temperaturze 4°C, jednak nie dłużej niż 7 dni przed rozpoczęciem badań.

Przygotowanie próbki

Przygotowanie próbek przeznaczonych do testów serologicznych lub molekularnych.

W celu dalszego przetworzenia próbki należy zważyć około 0,5 g materiału roślinnego, pociąć na małe części i umieścić w plastikowej torebce lub moździerzu. Przetwarzanie można wykonywać ręcznie lub z zastosowaniem odpowiednich urządzeń: szczegółowe informacje zawarto w Standardzie EPPO PM7/32 (1).

Elisa

Dodać do próbki około 20 objętości buforu ekstrakcyjnego i poddać homogenizacji. Skład

zastosowanego buforu ekstrakcyjnego opisano z Załączniku 1b. Wyekstrahowana próbka jest przygotowana do nakładania.

Badania molekularne

Dodać do próbki około 10 objętości buforu ekstrakcyjnego (Załącznik 1d) i poddać homogenizacji. Do 1 ml homogenatu dodać 50 µl 20% SDS i inkubować przez 20 min w temperaturze 65°C. Następnie dodać 0,25 ml 5M octanu potasu i inkubować w 0°C (łaznia lodowa) przez 20 min. Próbki wirować z prędkością 12 000 obr/min przez 15 minut, supernatant wytrącić za pomocą etanolu i zawiesić w 40 ul sterylnej wody. W hybrydyzacji dot-blot każde przygotowane 5ul kwasu nukleinowego jest poddawane denaturacji przez dodanie 3 ul 20 x SSC i 37% formaldehydu (10 min w 65°C). Wreszcie porcje próbek są nanoszone na dodatnio naładowaną nylonową membranę i mocowane przez sieciowanie UV. Membrany przed rozwijaniem podczas molekularnej hybrydyzacji mogą być przechowywane przez kilka lat w suchym miejscu. W przypadku RT-PCR używane jest 0,5 ul kwasu nukleinowego.

Badanie na zdrewniałych roślinach wskaźnikowych

Wirus może być wykryty przez szczepienie na odpowiednich zdrewniałych roślinach wskaźnikowych. Badanie szklarniowe zalecane jest z użyciem GF305 w temperaturze 20°C przez około 3 miesiące. Badanie polowe na śliwach Shiro wymaga około 2 lat (ISHS, 1998). Wskaźnik GF305 ujawnia ogólnie słabe chlorotyczne wzory (Web Rys. 3), podczas gdy Shiro daje reakcję w zakresie od cienkiej siateczki do klasycznych liniowych wzorów. Równie dobrymi roślinami wskaźnikowymi dla APLPV w warunkach szklarniowych może być kilka europejskich odmian śliwek, np. "President", „Regina Claudia verde”, „Blue Free" (Alayasa *et al.*, 2003); (Web rys. 4). Badanie na zdrewniałych roślinach wskaźnikowych jest bardzo długotrwałe i odpowiednie jedynie w przypadku, gdy takie samo badanie było zrobione również dla innych wirusów. W każdym razie, ostateczna identyfikacja wymaga serologicznych lub molekularnych testów.

Testowanie na wskaźnikach zielnych

APLPV może być przenoszony z sokiem roślinnym na wiele gatunków roślin zielnych, które często pozostają zainfekowane bezobjawowo. Zielne rośliny wskaźnikowe powinny być obserwowane po 2-3 tygodniach uprawy w szklarni w warunkach kontrolowanej temperatury 20°C. Stosowanymi roślinami wskaźnikowymi są *Nicotiana occidentalis*, *Chenopodium amaranticolor*, *Vigna unguiculata*. Roślina wskaźnikowa *N. occidentalis* rozwija chlorotyczne plamy i nekrotyczne pierścienie (Web Rys. 5); *Ch. amaranticolor* chlorotyczne plamy, deformacje liści i zahamowanie części wierzchołkowej (Web Rys. 6) i *Vigna unguiculata* deformacje liści.

Metoda zastosowana oddzielnie podczas wykrywania wirusów nie jest wiarygodna, jednak może być stosowana jako badanie uzupełniające, lub może służyć do wykrywania kilku wirusów. W każdym razie, ostateczna identyfikacja wymaga serologicznych lub molekularnych testów.

Badania serologiczne

APLPV nie jest serologicznie pokrewny z żadnym z pozostałych ilarwirusów, które mogą porażać owocowe drzewa pestkowe. DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA) jest wykonywana według Clarka i Adamsa (1977), zgodnie z protokołem opisanym w Załączniku 2 i materiałach opisanych w Załączniku 1a. ELISA jest metodą wiarygodną i szybką, wymagającą stosunkowo prostego wyposażenia i jedynie krótkiego szkolenia. Dostępny na rynku zestaw ELISA może wykazywać reakcje ze zdrową tkanką roślinną. Aby rozwiązać ten problem, zobacz szczegóły w

Załączniku 1b.

Badania molekularne

Dot blot hybrydyzacja

Dot blot hybrydyzacja jest przygotowywana według szczegółowego protokołu opisanego przez Pallas *et al.* (1998), zamieszczonego w Załączniku 3 i materiałach opisanych w Załączniku 1c i 1d. Synteza sondy „riboprobe” znakowanej digoksygeniną przeprowadza się według Mas *et al.* (1993) i Pallas *et al.* (1998), z użyciem szczegółowego protokołu opisanego w Załączniku 3. Do tej pory zostały opracowane trzy różne sondy „riboprobes” wykrywające APLPV (Scott & Zimmerman, 2001; Alayasa *et al.*, 2003; Sánchez-Navarro *et al.*, 2005). Tylko w jednym przypadku (sonda „riboprobe PCP-APLPV”; Sanchez-Navarro *et al.*, 2005) został wyznaczony limit czułości przy użyciu serii rozcieńczeń zainfekowanej tkanki. Żadna z trzech sond „riboprobes” nie wchodzi w reakcje krzyżowe hybrydyzacji z innymi ilarwirusami (ApMV, *Prune dwarf ilarvirus*, PNRSV). Hybrydyzacja molekularna jest bardziej wiarygodna niż ELISA, szczególnie w badaniach wykonywanych poza optymalnym sezonem badań (Al Rwahnih *et al.*, 2004). Można ją zatem uznać jako zadowalającą alternatywę w rutynowej diagnostyce.

RT-PCR

RT-PCR jest przeprowadzany zgodnie ze szczegółowym protokołem Sánchez-Navarro *et al.* (2005) lub Scott & Zimmerman (2001), opisanym w Załączniku 3 i materiałach opisanych w Załączniku 1c. Uzyskany amplifikowany produkt składa się odpowiednio z 563 pz lub 123 pz. Startery opisane przez Sánchez-Navarro *et al.*, 2005 amplifikują aż 8 różnych szczepów APLPV odmiennego pochodzenia geograficznego, zostały one poddane walidacji w szerokim zakresie stosowania. Granica wykrywalności APLPV dotyczy jednocześnie RT-PCR dla ośmiu wirusów drzew pestkowych, przez porównanie z pojedynczym testem (Sánchez-Navarro *et al.*, 2005).

Raport z badania

Wytyczne dotyczące raportu z badania podane są w normie EPPO PM7 / - (w przygotowaniu).

Informacje dodatkowe

Dalsze informacje na temat organizmu można uzyskać pod adresem:

Istituto Agronomico Mediterraneo, Via Ceglie 9, 70010 Valenzano, Bari (IT); E-mail: myrta@iamb.it

Istituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, Avenida de los Naranjos s/n 46022 Valencia (ES); E-mail: vpallas@ibmcp.upv.es.

Podziękowania

Protokół ten został opracowany przez A. Myrta, Istituto Agronomico Mediterraneo, Valenzano (IT) oraz V. Pallás, Universidad Politécnica de Valencia (ES).

Materiały źródłowe¹

¹ Została zachowana oryginalna pisownia (przyp. tłum.)

- Al Rwahnih M, Myrta A, Herranz MC & Pallás V (2004) Tracking American plum line pattern virus in plum by ELISA and dot-blot hybridisation during a whole year. *Journal of Plant Pathology* 86, 167–169.
- Alayasa N, Al Rwahnih M, Myrta A, Herranz MC, Minafra A, Boscia D, Castellano MA & Pallás V (2003) Identification and characterization of an American plum line pattern virus (APLPV) isolate from Palestine. *Journal of Plant Pathology* 85, 3–7.
- Clark MF & Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34, 475–483.
- Fulton RW (1982) Iilar-like characteristics of American plum line pattern virus and its serological detection in *Prunus*. *Phytopathology* 72, 1345–1348.
- Fulton RW (1984) American plum line pattern virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses no. 280. AAB, Wellesbourne (GB).
- Herranz MC, Alayasa N, Al Rwahnih M, Myrta A, Minafra A, Boscia D & Pallás V (2003) The coat proteins of isolates of American plum line pattern virus from different origins show very low genetic diversity. 19th International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops, P. 29. Valencia (ES).
- ISHS (1998) Detection of virus and virus-like diseases of fruit trees. *Acta Horticulturae* no. 472, 761–783.
- Kirkpatrick HC, Cheney PW & Linder RC (1964) Mechanical transmission of plum line pattern virus. *Plant Disease Reporter* 48, 616–618.
- Más P, Sánchez-Navarro JA, Sánchez-Pina MA & Pallás V (1993) Chemiluminescent and colorigenic detection of cherry leaf roll virus with digoxigenin-labelled RNA probes. *Journal of Virological Methods* 45, 93–102.
- Myrta A, Abadi H, Herranz MC, Al Rwahnih M, Di Terlizzi B, Minafra A & Pallás V (2002) First report of American plum line pattern virus (APLPV) in Albania, Italy and Tunisia. *Journal of Plant Pathology* 84, 188 (Abstract).
- Németh M (1986) *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Martinus-Nijhoff, Dordrecht (NL).
- Pallás V, Sanchez-Navarro JA, Mas P, Cañizares MC, Aparicio F & Marcos JF (1998) Molecular diagnostic techniques and their potential role in stone fruit certification schemes. In: *Options Méditerranéennes, Série B/ No. 19, Stone Fruit Viruses and Certification in the Mediterranean Countries: Problems and Prospects* (Ed. Di Terlizzi, B, Myrta, A & Savino, V), pp. 191–208. CIHEAM/IAMB, Bari (IT).
- Paulsen AQ & Fulton RW (1968) Hosts and properties of a plum line pattern virus. *Phytopathology* 58, 766–772.
- Sánchez-Navarro JA, Aparicio F, Herranz MC, Minafra A, Myrta A & Pallás V (2005) Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 111, 77–84.
- Scott SW & Zimmerman MT (2001) American plum line pattern is a distinct ilarvirus. *Acta Horticulturae* no. 550, 221–228.

Załącznik 1. Materiały

Materiały do wykrywania w tkankach roślinnych APLPV testami serologicznymi standardowe kontrole negatywna i zainfekowana APLPV są dostępne na rynku.

Bufory do testu ELISA

Informacji o buforach do testu ELISA należy szukać w normie EPPO PM 7/32 (1). Jeśli w badaniu z użyciem konwencjonalnego buforu ekstrakcyjnego uzyskuje się niespecyficzne reakcje w stosunku do zdrowej tkanki roślinnej, ekstrakcję należy wykonać z użyciem następującego buforu, w stosunku 1:100 (w:v): albuminy surowicy wołowej (BSA) 2 g, poliwinylpirolidonu (PVP) o MW 24-40 000 20 g, azydku sodu 0,2 g, PBS-Tween 1 × 1 litr o pH 7,2-7,4.

Materiały do wykrywania APLPV w tkankach roślinnych testami molekularnymi

Sondy APLPV są dostępne dla instytucji non-profit w Instituto de Biología Molecular Celular de Plantas, Universidad de Valencia-Politécnica CSIC, Avenida de los Naranjos s / n 46022 Valencia (SP).

One-step RT-PCR

Oligonukleotydowe sekwencje starterów (Sánchez-Navarro *et al.*, 2005.):

VP 340 (sensowna) 5'-3 'GGTCGTCAAGGGAGAGGC (nt 1490-1508)

VP 339 (antysensowna) 5'-3 'GGCCCCTAAGGGTCATTTC (nt 2034-53)

Oligonukleotydowe sekwencje starterów (Scott & Zimmerman, 2001):

(sensowna) 5'-3 'GATATTGCTGCCTCACAAGTGG (nt1663-1684)

(antysensowna) 5'-3 'CCTCGAGAAATTTCTCGAGATGG (nt1562-1584)

Molekularna hybrydyzacja

pAPLPV-385 dig riboprobe: (126-510 nt RNA 3) opisana przez Alayasa *et al.* (2003).

PCP-APLPV: (1490-2053 nt RNA 3) opisana przez Sánchez-Navarro *et al.* 2005).

Bufory do testów molekularnych

Bufor ekstrakcyjny: 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 7,0; 500 mM NaCl, 10 mM β -merkaptoetanolu.

Roztwór prehybrydyzacyjny: 50% formamid, SSC 5x; 0,1% N-Lauroylsarcosine; 0,02% SDS i bufor blokujący 10x.

Bufor 1: 0,1 M kwas maleinowy; 0,15 M NaCl; ustalić pH 7,5 z użyciem NaOH.

Bufor blokujący: Bufor 1; czynnik blokujący 1 x (ROCHE 1 096 176).

Bufor 3: 1 M Tris-HCl pH 9.5; 0.1 M NaCl.

Załącznik 2. Szczegółowe protokoły do badań serologicznych

DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977) należy wykonać w sposób opisany w normie EPPO PM 7/32 (1). Jeśli to możliwe, powinny być uwzględnione kontrole pozytywne (o ile dostępny jest zainfekowany materiał roślinny, powinien on pochodzić od rośliny żywicielskiej tego samego gatunku, co badana roślina) oraz kontrole negatywne (zdrowy materiał roślinny i bufor). Wartości

uzyskiwane dla próbek w teście ELISA powinny być co najmniej dwukrotnością kontroli negatywnej.

Załącznik 3. Szczegółowe protokoły dla testów molekularnych

Synteza sond „riboprobes” znakowanych digoksygeniną

Linearyzować 1 µg pAPLPV385 (Alayasa *et al.*, 2003) lub pCP-APLPV (Sanchez-Navarro *et al.*, 2005), obie zawierają częściową sekwencję RNA 3 z *SacI* i *NcoI*, lub wykonać tępe końce z T4 polimerazą DNA, oczyścić z zastosowaniem roztworu fenolu:chloroformu, strącić z etanolem i zawiesić w sterylnej wodzie. Syntetyzować sondę dig-riboprobe z polimerazą T7 RNA (Alayasa *et al.*, 2003) i polimerazą SP6 RNA (Sánchez-Navarro *et al.*, 2005) w sposób opisany przez Mas *et al.* (1993).

Reakcja transkrypcji (20 µl): 1µg linearyzowanego plazmidu, 2 µl 10x bufor do transkrypcji, 40 U T7/SP6 polimerazy RNA (Roche 881 767), 20 U inhibitora RNaz (Amersham Pharmacia Biotech E 2310Y), 2 µl 10X DIG RNA Labeling Mix (Roche 1 277 073). Inkubować 2 godziny w temperaturze 37°C.

Hybrydyzacja molekularna

Membrany inkubować w roztworze prehybrydyzacyjnym w temperaturze 68°C przez co najmniej 1 h. (Załącznik 1). Przygotować roztwór hybrydyzacyjny używając 50-100 ng wcześniej zdenaturowanej (10 min w temperaturze 65°C) sondy „riboprobe” na ml roztworu prehybrydującego, a następnie inkubować membranę co najmniej 4-6 h (w nocy). Po hybrydyzacji w temperaturze pokojowej przemyć membranę, najpierw 2 × 5 min w 2x SSC zawierającym 0,1% SDS, a następnie w temperaturze 68°C, 2 × 15 min w 0,1 x SSC zawierającym 0,1% SDS. Pozostałe kroki są wykonywane w temperaturze pokojowej. Przemyć 2 × 5 min buforem 1 zawierającym 0,3% Tween 20 (Sigma P-1379). Zablokować membranę z buforze blokującym przez 30 min i inkubować z anty-digoksygeniną-AP fragmentów Fab (Roche 1 093 274) rozcieńczonych 1: 10 000 w buforze blokującym. Przemyć membranę 2 × 15 min w buforze 1 zawierającym 0,3% Tween 20, a następnie w buforze 3 przez 5 minut. Umieścić membranę w plastikowej torbie z chemiluminescencyjnym substratem (CSPD w rozcieńczeniu 1: 100 w buforze 3, 1 655 884 Roche) przez 5 minut w ciemności. Usunąć nadmiar CSPD, unikając całkowitego przesuszenia membrany. Pozostawić filmy do naświetlenia na 10-60 min.

Amplifikacja RT-PCR

Wykrywanie APLPV z użyciem starterów VP 340-VP 339 opisanych przez Sánchez-Navarro *et al.* (2005):

VP 340 (sensowny) 5'-3 'GGTCGTCAAGGGAGAGGC

VP 339 (antysensowny) 5'-3 'GGCCCCTAAGGGTTCATTTC

Reakcja One-step RT-PCR: 0,4 µl SuperScript III one-step RT-PCR (Platinum Taq DNA polymerase Kit, Invitrogen); 5 µl 2X SuperScript III bufor; 0,1 µl starter VP 340 (0,75 pmol); 0,1 µl starter VP 339 (0,75 pmol); 0,5 µl TNA; 3,9 µl H₂O.

Warunki one-step RT-PCR: 50°C przez 30 min; 2 min w temperaturze 94°C; 40 cykli denaturacji w temperaturze 94°C przez 15 s, 50°C przez 30 s, 68°C przez 1 min, a wreszcie 68°C przez 7 min.

Wykrywanie APLPV z użyciem starterów opisanych przez Scotta i Zimmerman (2001):

(sensowny) 5'-3 'GATATTGCTGCCTCACAAGTGG

(antysensowny) 5'-3 'CCTCGAGAAATTTCTCGAGATGG

Warunki RT-PCR: 1 cykl 94°C przez 3 minuty; 35 cykli denaturacji w temperaturze 94°C przez 30

s, 60°C przez 30 s, 72°C przez 2 min

Elektroforeza produktów PCR

Wykonać zgodnie ze Standardem EPPO PM 7/32 (1).

Web Rys. 1. Objawy wywołane przez APLPV na śliwie japońskiej: a) chlorotyczne pierścienie, wczesną wiosną, b) wzór liścia dębu, latem, c) białokremowe wzory, późnym latem.

a)



b)



c)



Web Rys. 2. Chlorotyczne do złotych brzegi blaszki liściowej na śliwie japońskiej powodowane przez APLPV.



Web Rys.3. Chlorotyczne wzory powodowane przez APLPV na GF305 w szklarni



Web Rys. 4. Chlorotyczne pierścienie i przejaśnienia żyłek powodowane przez APLPV na europejskich śliwach „President” w szklarni.



Web Rys. 5. Chlorotyczno-nekrotyczne plamy i pierścienie na *N. occidentalis*.



Web Rys. 6. Chlorotyczne plamy, deformacje liści i zamieranie wierzchołków na *C. amaranticolor*



Wszystkie zdjęcia dzięki uprzejmości A. Myrta, IAM Bari (IT).

Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Ewa Hennig (GIORiN CL)	Justyna Pięcińska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
22.10.2012	20.12.2012	