

## ИЗДРЕБНЯВАНЕ ПЛОДОВЕТЕ НА ЧЕРЕШАТА (LChD) – ИКОНОМИЧЕСКИ ВАЖНА ВИРУСНА БОЛЕСТ ПРИ ЧЕРЕШАТА И ВИШНАТА

АНЕЛИЯ БОРИСОВА\*, НИКОЛАЙ ПЕТРОВ\*\*

\* *Институт по земеделие, Кюстендил*

\*\* *Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Н. Пушкиров“, София*

\*E-mail: anelija@gmail.com

## Little Cherry Disease (LChD) – Economically Important Viral Diseases in Sweet and Sour Cherries

A. Borisova\*, N. Petrov\*\*

\* *Institute of Agriculture, Kyustendil, Bulgaria*

\*\* *N. Pushkarov Institute of Soil Science, Agrotechologies and Plant Protection, Sofia, Bulgaria*

### Abstract

In this review are presented the results of research on the nature and characteristics of the disease Little cherry disease – LChD. Currently, two different viruses belonging to the family *Closteroviridae* are associated with the LChD. These are Little cherry virus 1 (LChV-1) and Little cherry virus 2 (LChV-2). In the publication is made a detailed and thorough examination of geographical distribution and hosts; symptoms of the disease in susceptible species and cultivars; economic significance of the disease; means of movement and dispersal; detection and inspection methods; control. In Bulgaria, disease was not detailed and thoroughly investigated. There is no information about the spread and economic damage caused by viruses.

**Key words:** cherry, viruses, LChD, distribution, diagnosis

### Географско разпространение и гостоприемници

За пръв път болестта е наблюдавана през 1933 г. в British Columbia, Канада и е описана като вирусна болест при черешата и вишната през 1947 г. (Foster and Lott, 1947). Доказано е, че патогенът, причиняващ латентна вирусна инфекция при декоративните череша (*Prunus serrulata* sv. Shirofugen и sv. Kwanzan) при черешата (*Prunus avium*) причинява издребняване на плодовете (Reeves et al., 1955). В средата на миналия век въз основа на симптомите, които предизвиква и кръга гостоприемници, вирусолозите от Канада и САЩ приемат, че *Little cherry virus* и *Cherry K* (Kwanzan) и *S* (Shirofugen) *virus* са един и същи вирус (Reeves and Cheney, 1956; Wilks and Reeves, 1959). Установено е, че първата епидемия в Канада е свързана с инфектирани с вируса дървета *Shirofugen*, засадени в близост до черешова градина. Изследвания, проведени

по това време и в други държави показват, че съществуващата латентна инфекция в декоративните череша е причина за разпространението на вируса (Reeves and Cheney, 1963; Posnette, 1965; Tanaka and Hirose, 1966).

Черешата (*P. avium*) е най-чувствителният вид към **LChD** (Little cherry disease). Характерните за болестта симптоми по плодовете са наблюдавани също при вишната (*P. cerasus*) и при *P. pensylvanica*. Декоративните череша *P. incisa*, *P. serrulata*, *P. sieboldii*, *P. subhirtella* и *P. yedoensis* са латентни носители на вируса. Сортите от декоративния вид *P. serrulata* – cvs. Kanzan and Shirofugen, *P. emarginata*, *P. mahaleb* and *P. tomentosa* проявяват толерантност към патогена. Кайсията (*P. armeniaca*), сливата (*P. domestica*), прасковата (*P. persica*) и *P. virginiana* се приемаха за имунни към вирусната инфекция. При посочените костилкови овощни видове вирусът не е пренесен

експериментално чрез присаждане (Welsh and Cheney, 1976). При изследване, проведено в Южна Италия през 2006 – 2007 г. чрез RT-PCR е установена естествена безсимптомна инфекция от **LChV-1** при четири сливови дървета, една праскова и един бадем (Matic et al., 2007). Това е и първото съобщение за естествено разпространение на вируса извън видовете череша и вишна.

Косвени доказателства посочват, че болестта LChD произхожда от Япония, където патогенът е често срещан при декоративните, цъфтящи череша. Най-вероятно днес е разпространена по целия свят, където се отглеждат череша (Németh, 1986; Eastwell, 1997). Заболяването се съобщава в: Европа – Великобритания (Garrett et al., 1985), Германия (Keim-Konrad and Jelkmann, 1996; Jelkmann et al., 1997; Schröder and Petruschke, 2010), Италия (Matic et al., 2007), Полша (Komorowska and Cieslinska, 2004), Чехия (Ludvikova and Sucha, 2011), Гърция (Katsiani et al., 2012). Проучени са изолати и от редица други европейски страни (Vitushkina et al., 1997; Rybak et al., 2004); Северна Америка – САЩ (Uyemoto and Scott, 1992; Eastwell and Bernardy, 2001), Канада (British Columbia) (Welsh and Cheney, 1976; Eastwell, 1997; Bernardy et al., 2002); Азия – Турция (Ulubas Serçe et al., 2011), Япония (Isogai et al., 2004), Китай (Rao et al., 2011); Океания – Нова Зеландия (Fry and Wood, 1970).

В България липсват сведения за разпространението на LChD и икономическите щети, причинени от вирусите.

#### **Симптоми на заболяването при чувствителните видове и сортове**

Обикновено дърветата изглеждат нормално и основната проява на болестта са симптомите по плодовете, но LChV може да доведе до намаляване на жизнеността на инфектираните дървета като цяло.

Плодовете на черешовите и вишневи дървета, инфектирани с вируса са по-дребни от нормалните, с по-блед цвят и влошени вкусови качества. Най-силно изразени симптоми са установени при сорт Ламберт, чийто плодове издребняват силно, като се променя формата и оцветяването им. Инфектираните плодове не успяват да натрупат нормално захари и киселини, в резултат на което им липсва сладост и аромат. Вирусът редуцира и растежа на дърветата от сорт Ламберт (Wilks and Milbrath,

1956). Подобни симптоми се наблюдават и при сорта Хеделфингерска. Сортовете като Бинг и Early Rivers се характеризират с шокова фаза на болестта. Плодовете на заразените дървета възвръщат почти нормалния си размер и цвят няколко години след първоначалната инфекция, но вкусът им никога не се възстановява. При сортовете с твърдо плодово месо като Ван и Сам, има намаление в размера и вкусовите качества на плодовете, но цветът и формата им обикновено не се променят. При вишневия сорт Монтморенси се наблюдава също промяна в размера и оцветяването на плодовете. При сортовете с червени и жълти плодове симптомите са подобни, но не толкова ясно изразени (Anonymus, 1998). Силно изразените симптоми на заболяването се проявяват отново при всички сортове след всяка хладна пролет (<http://healthyplants.wsu.edu/wp-content/uploads/2010/11/Little-cherry-fact>).

Проучена е реакцията на различни сортоподложкови комбинации към LChV. Установено е, че въздействието на LChV върху размера на плодовете е по-голямо, когато отглежданите сортове са присадени върху подложка Mazzard в сравнение с подложката *P. mahaleb* (Milbrath and Reynolds, 1964). Потвърдено е също така, че LChV е свързан със синдрома потиснат растеж на *Prunus serrulata* "Kwanzan" (Matic et al., 2009a). Установена е частична или пълна толерантност при някои от европейските (Posnette, 1965) и новозеландските черешови сортове (Wood, 1993), което е вероятно и причина вирусът да не е от първостепенно значение в областите, където са засадени тези сортове.

Червеникаво оцветяване на листата се появява при инфектираните дървета от сорта Сам, Мазард F12/1 и Deacon в края на август или началото на септември. При сортовете Бинг и Ван се появява по-слабо изразено червеникаво оцветяване на листата.

Черешовият сорт Canindex 1 реагира с много яркочервено оцветени листа при инфекция с LChV и се използва като индикатор за тестване на вируса (Hansen and Green, 1985).

Симптомите на редица други болести и физиологични смущения при черешата и вишната приличат на тези, причинени от вируса. Зимните студове водят до отслабване на дърветата и редуциране растежа на клонките, листата и плодовете. Богатата, обилна реколта често

също води до плодове, които са по-дребни от нормалните, но вкусът им остава непроменен. Цинковият дефицит редуцира размера на листата и плодовете и засилва симптомите на болестта (Wilks and Stewart, 1961). Заболяването **Хикс болест по черешата** (Western X-Disease), причинено от фитоплазмата X-Disease phytoplasma също се характеризира с дребни плодове с влошени вкусови качества. Характерно за тази болест е, че тя не се разпространява бързо и често остава само по някои от клоните на инфектираното дърво в продължение на много години. Плодовете са почти белезникави на цвят и имат горчив вкус. Докато плодовете, инфектирани с LChV са безвкусни, но не и горчиви (Wilks and Milbrath, 1956).

#### **Икономическа значимост на заболяването**

Икономическата значимост на вирусната инфекция LChV е много различна в отделните райони на света. Болестта има опустошителен ефект върху черешовата индустрия в област Kootenay, British Columbia, Канада. Продукцията намалява от 680 000 kg през 1947 г. до 68 000 kg през 1979 година. Едни от основните причини за това са засаждането на чувствителния сорт Lambert и драматичното увеличение на плътността на вектора преносител на вируса *Phenacoccus aceris* (Eastwell, 1997). След въвеждането на строги фитосанитарни мерки от правителството, включващи редовни инсектицидни пръскания срещу вектора преносител на вируса, черешопроизводството в Западна Канада е възстановено (Eastwell and Li, 1994; Anonymous, 1998).

В края на миналия век тежка епидемия от LChD е регистрирана в Altes Land регион в близост до Хамбург, Северна Германия (Harms et al., 1996; Lakotta, 2000). Начинът на разпространение на вируса в тази област е неизвестен, тъй като преносителят на вируса не е масово разпространен в този регион. Изкоренените заразени дървета са заменени със сертифициран вирусносвободен посадъчен материал.

През последните три години (2010 – 2012) LChV-2 представлява сериозен проблем за черешопроизводството в Северозападния Тихоокеански регион (Pacific Northwest), щата Вашингтон, САЩ. Епидемията се разраства в резултат на благоприятните климатични условия на три последователни години, характери-

зиращи се с хладно и влажно време през пролетта, условия много подходящи за проявата на симптомите на LChD. Въпреки това не е известно дали увеличаването на броя на дървета със симптоми се дължи на метеорологични условия или самият вирус се разпространява бързо. Инфекцията с LChV-2 е била потвърдена чрез молекулярни тестове. Заразените дървета са изкоренени (Eastwell, 2012).

#### **Вируси, свързани със заболяването LChD**

Въпреки че заболяването LChD е описано като вирусна болест преди повече от 80 години, до края на миналия век е отбелязан значително малък напредък в идентифицирането на причинителя, дължащо се на трудности при получаването на пречистен вирусен препарат от инфектираните дървета.

През 70-те години на миналия век са идентифицирани дълги flexuous вирусни частици в флоемната тъкан на инфектираните дървета с характеристики на closteroviruses (Raine et al., 1975; Raine et al., 1979).

С развитието на методите на молекулярната биология през 1996 г. closterovirus, асоцииран с LChD в Германия е идентифициран и наречен Little cherry virus (LChV) (Keim-Konrad and Jelkmann, 1996). Неговата пълна нуклеотидна последователност е определена и публикувана през 1997 г. (Jelkmann et al., 1997). Фактът, че този вирус е диагностициран при някои от дърветата със симптоми на LChD, но не при всички, показва, че и друг вирус е отговорен за заболяването. Rott and Jelkmann (2001) съобщават частичната нуклеотидна последователност на втори closterovirus, свързан с болестта Little cherry virus-2 (LChV-2). С цел да бъдат разграничени двата вируса те предлагат LChV да бъде наименуван *Little cherry virus-1* (LChV-1). LChV-2 е нов *closterovirus* с молекулярно сходство с *Grapevine leafroll-associated virus-1* (GLRaV-1) и *GLRaV-3* и много далечно родство с *LChV-1*. Въз основа на сравнение на частичните нуклеотидни последователности, LChV-2 е същият вирус, преди това идентифициран във връзка с LChD в Канада и САЩ (Theilmann et al., 2002; Eastwell and Bernardy, 2001).

През 2005 г. е определена и публикувана и пълната нуклеотидна последователност на изолат USA6b на LChV-2 (Rott and Jelkmann, 2005).

Понастоящем два вируса, принадлежащи към сем. *Closteroviridae* са свързани със за-

боляването LChD. Това са Little cherry virus 1 (LChV-1) and Little cherry virus 2 (LChV-2). LChV-2 е вид към род *Ampelovirus* на сем. *Closteroviridae*, докато LChV-1 е отделен вид в сем. *Closteroviridae*, но не е причислен към никой род (Martelli et al., 2005). Вирусът, съобщен като LChV-3, изолат LC5 (Theilmann et al., 2002) сега се приема за щам на LChV-2 (Theilmann et al., 2004). LChV-4, използвано от Bernardy et al. (2002) като експериментално работно име за изолат на LChV има 88% нуклеотидната последователност, идентична с типични изолати на LChV-1; това ниво на различие сега е признато като доста типично между щамовете на closteroviruses (Martelli et al., 2005).

LChV-1 и LChV-2 са диагностицирани от дърветата със симптоми на LChD самостоятелно и/или в смесена инфекция помежду си. Въз основа на резултатите от проведените тестове с дървесни индикаторни видове и данните от прилагането на RT-PCR анализ авторите предполагат, че LChV-1 инфекцията остава в повечето случаи латентна или закъснява в проявата на симптомите, докато LChV-2 проявява типичните описани в литературата симптоми за LChD (Jelkmann et al., 2008). Според Eastwell (2012) LChV-2 обикновено причинява много по-силни симптоми в сравнение с LChV-1, а когато двата вируса са в смесена инфекция симптомите се засилват. Резултатите, получени при експерименталното инокулиране на млади черешови дървета сорт Регина с LChV-1 или LChV-2, или смесено с двата вируса показват, че в пълен контраст на LChV-2, LChV-1 не оказва влияние върху добива, размера и единичното тегло на плода и стъблото (Schröder and Petruschke, 2010). В смесена инфекция LChV-1 изглежда, че смекчава неблагоприятното въздействие на LChV-2 върху добива и обиколката на стъблото за разлика от становището на Eastwell (2012), който посочва, че при смесена инфекция симптомите се засилват.

#### **Начини за разпространение на вирусите**

В разсадниците и овощните градини LChV-1 и LChV-2 се разпространяват главно чрез използването на заразен посадъчен материал (калеми и подложки). Именно използването на инфектирани дръвчета е начинът за най-далечно разпространение на вирусите. При допир на корени на инфектирано с корени на здраво дърво също може да се осъществя-

ви пренасяне на вируса. Липсват сведения за пренасяне чрез прашец и семена. Не е известен вектор преносител на LChV-1, докато LChV-2 се пренася от дърво на дърво чрез псевдощитоносната въшка Apple mealybug (*Phenacoccus aceris* Signoret). *Phenacoccus aceris* е идентифицирана като вектор на LChV от Raine et al. (1986). Този неприятел вреди по ябълката, прасковата, кайсията, черешата, дюлята, мушмулата, клена, ясена, глога, конския кестен, липата, дъба и бряста, и според Григоров (1976) е разпространен в много райони на България. Намножава се по-масово в градини, където не се повежда системна борба. Ниски популации на този неприятел обикновено не причиняват преки щети на черешовите дървета, неговото икономическо значение е по-скоро косвено като вектор преносител на вируса.

През 2012 г. изследователи от университета във Вашингтон, САЩ проучват ролята на псевдощитоносната въшка Grape mealybug (*Pseudococcus maritimus*) като вектор преносител на LChV-2 (Eastwell, 2012). Те установяват, че след 7-дневен период на заразяване и 7-дневен период на пренасяне *Pseudococcus maritimus* пренася вируса в 80% от черешовите дървета сорт Бинг, включени в експеримента. Увеличаването на плътността на този неприятел в костилковите овощни градини на Pacific Northwest може частично да обясни тревожното нарастване на разпространението на болестта в този регион.

#### **Методи за идентифициране на вирусите**

Методите за идентифициране на LChV-1 и LChV-2, както на всички растителни вируси се основават на свойствата на самите вируси, а именно на техния патогенитет – индикаторен метод, морфологията на вирусните частици – електронномикроскопски изследвания, на свойствата на капсидния белтък – имунологични методи и на свойствата на нуклеиновата киселина – молекулярни методи. На настоящия етап четирите метода в различна степен намират приложение за диагностициране и идентифициране на LChV-1 и LChV-2.

**Биологични методи.** Идентифициране на LChV-1 и LChV-2 чрез **механично пренасяне** върху тревисти видове не е известно. С цел да се направи оценка на потенциални тревисти видове като индикатори растения за диагнос-

тика на LChV-1 и LChV-2 е проведен експеримент за пренасяне на вирусите от инфектирани подложки *Prunus avium* F12 чрез кускута *Cuscuta europea* на *Nicotiana occidentalis* '37B'. LChV-1 е пренесен успешно (потвърдено чрез RT-PCR анализ), докато опитът с LChV-2 е бил неуспешен (Jelkmann et al., 2010).

Основен метод за диагностициране на вируса чрез биологичните тестове е използването на дървесни индикатори чрез метода на двойното окулиране. Надеждни индикатори, реагиращи с ясни признаци при инфекция с LChV са черешовите сортове Сам и Canindex 1. След инфекция по листата на дърветата на тези сортове се появява червеникаво оцветяване в края на месец август и началото на септември. Canindex 1 е по-добрият индикатор, тъй като реагира с по-ясно изразени симптоми и по-ранна проява през вегетацията (Hansen and Green, 1985). При изследване, проведено през 90-те години на миналия век в Нова Зеландия е потвърдено, че Canindex 1 е по-добър индикатор за LChD в сравнение с използвания преди него сорт Ван като индикатор (Wood, 1993).

#### **Електронномикроскопски изследвания**

При електронномикроскопските изследвания на инфектираните тъкани от болни растения със симптоми на LChD е установено присъствието на филаментозни и closterovirus подобни частици във флоемата и в паренхимна тъкан (Raine et al., 1975; Raine et al., 1979). Чрез UV микроскопия на напречни сечения на дръжки на листа на заразени черешови дървета са наблюдавани флуоресцентни включения в стените на флоемните клетки след оцветяване с акридин оранжево. Тази реакция е наблюдавана, както при дръжки на листа на дървета със симптоми, така също и при листни дръжки на латентно инфектирани декоративни череши (*P. serrulata*) (Legrand and Verhoyen, 1985).

Микроскопският анализ на високопречистения препарат на изолат LC5 на LChV-2 от инфектирани дървета сорт Ламберт показва дължина на заснетите частици от 1,600 до 1,700 nm (Eastwell and Bernardy, 2001).

#### **Серологични методи**

В специализираната търговска мрежа ELISA kits за диагностика на LChV-1 и LChV-2 не се предлагат. Вирусите се размножават в много ниска концентрация в растенията гостопри-

емници и това не позволява получаването на пречистени вирусни частици, подходящи за производството на антитела и прилагането на серологичните методи. За серологично диагностициране на LChV-1 и LChV-2 са разработени единствено реагенти за лабораторни цели (Theilmann et al., 2002; Matic et al., 2009b). След експресия и пречистване на капсидни протеини на изолат LC5 на LChV-2 в *E. coli* и получаването на поликлонални антитела е разработена модификация на DAS-ELISA метода от Theilmann et al. (2002). Методът е използван за откриване на болни дървета в основните райони за производство на череши в област British Columbia, Канада. През 2009 г. са получени и специфични антитела за капсидния протеин на LChV-1 чрез използването на ДНК праймери и and protein boost immunization (Matic et al., 2009b).

#### **Методи на молекулярната биология**

Прилагането на Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) анализ чрез използването на специфични олигонуклеотиди праймери за LChV-1 или LChV-2 е най-широко използваният метод за диагностика на вирусите по света (Keim-Konrad and Jelkmann, 1996; Jelkmann et al., 1997; Vitushkina et al., 1997; Rott and Jelkmann, 2001; Eastwell and Bernardy, 2001). Бързите темпове на развитие на молекулярната биология доведоха до усъвършенстване на методите. Широко приложение днес намира методът на Real-Time-PCR, разработен за диагностика на LChV-1 и LChV-2 от Jelkmann et al. (2008). Много често вирусите от сем. *Closteroviridae*, инфектиращи черешата се намират в смесена инфекция и тяхното едновременно тестиране е много по-удобно особено при широкомащабни изследвания. Quadruplex RT-PCR (quaRT-PCR) анализ за едновременно откриване Plum bark necrosis stem pitting-associated virus (PBNSPaV), LChV-1 и LChV-2 е успешно използван от колектива на Matic et al. (2010).

#### **Методи и средства за борба**

Борбата срещу LChD, както с всички останали вирусни болести се води главно чрез превантивни мерки, основно чрез производството на здрав вирусносвободен посадъчен материал. През 1991 г. Европейската организация по растителна защита разработи схемата за производство на сертифицирани – свободни от вируси (СВ) или тествани за вируси

(TB) овощни дръвчета и подложки. Вирусите **PNRSV**, **PDV**, **LChV**, **PPV** и **ACLSV** покриват категорията тестван за вируси сертифициран посадъчен материал от череша и вишна. Основните методи и средства за борба са: Използване на сертифициран вирусно свободен посадъчен материал при създаване на нови насаждения; Изкореняване на инфектираните черешови дървета; Избягване засаждането на декоративни череша в близост до насажденията, тъй като те са латентни носители на вируса и естествен резервоар за неговото разпространение; Химичен контрол на неприятеля *Phenacoccus aceris*, преносител на вируса.

В България болестта **LChD** и двата различни вируса, причиняващи заболяването не са подробно и задълбочено проучени. Липсват сведения за разпространението на **LChD** и икономическите щети, причинени от вирусите. Имайки предвид факта, че **LChV** влиза в категорията тестван за вируси сертифициран посадъчен материал от череша и вишна, и икономическите загуби, които нанасят в някои региони на света, е крайно необходимо тяхното проучване в България.

## ЛИТЕРАТУРА

**Григоров, С.** 1976. Специална ентомология. Земиздат, София, 545 с.

**Anonymous.** 1998. Little Cherry Disease in British Columbia Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, British Columbia Government.

**Bajet, N. B., Unruh, T. R., Druffel, K. L., and Eastwell, K. C.** 2008. Occurrence of two Little cherry viruses in sweet cherry in Washington State. *Plant Dis.*, 92: 234-238

**Bernardy, M. G., French, C. J., and Milks, M.** 2002. New variant of Little cherry virus associated with Little cherry disease of sweet cherry in British Columbia, Canada. *Plant Dis.*, 86: 1406

**Eastwell, K. C. and Li, T. S. C.** 1994. Status of the Little cherry disease eradication program in the Kootenay valley of British Columbia. *Can. Plant Dis. Surv.*, 74: 115-116

**Eastwell, K. C.** 1997. Little cherry disease – In perspective, p. 143-151. In: Filamentous Viruses of Woody Plants. P. L. Monette, ed. Research Signpost, Triandrum, India.

**Eastwell, K. C. and Bernardy, M. G.** 2001. Partial characterization of a closterovirus associated with apple mealybug-transmitted little cherry disease in North America. *Phytopathology*, 91: 268-273

**Eastwell, K.** 2012. WERA-020 – Washington State Report.

**Foster, W. R., T. B. Lott.** 1947. "Little Cherry", a virus disease. *Sci. Agr.*, 27: 1-6

**Fry, P. R., Wood, G. A.** 1970. Little cherry virus in New Zealand. *N. Z. J. Agric. Res.*, 13: 111-118

**Garrett, C. M. E., Fletcher, D. A., Trowell, S. D., Adams, A. N., Stickels, J. E., Barbara, D. J., Blake, V. S. A.** 1985. Report of East Malling Research Station for 1984, p. 163-164

**Isoyai, M. Aoyagi, J., Nakagawa, M., Kubodera, Y., Sato, K., Katoh, T., Inamori, M., Yamashita, K. and Yoshikawa, N.** 2004. Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry trees in Japan. *Phytopathol. Soc. Jpn.*, 70: 288-291

**Hansen, A. J., Green, L.** 1985. Canindex 1, a superior indicator cultivar for Little cherry disease. *Plant Disease*, 69, 11-12

**Harms, M., Büttner, C., Graf, H. and Schickedanz, F.** 1996. Untersuchungen zur Ausbreitung der virösen Kleinfrüchtigkeit der Süskirsche (little cherry disease) in Norddeutschen Erwerbsobstanlagen. *Erwerbs-Obstbau*, 1: 2-7

**Jelkmann, W., Fechtner, B. and Agranovsky, A. A.** 1997. Complete genome structure and phylogenetic analysis of little cherry virus, a mealybug-transmissible closterovirus. *J. Gen. Virol.*, 78: 2067-2071

**Jelkmann, W., Leible, S. and Rott, M.** 2008. Little cherry closteroviruses-1 and -2, their genetic variability and detection by Real-time-PCR. *Acta Hort.* (ISHS), 781: 321-330

**Jelkmann, W., Hergenahn, F., Berwarth, C.** 2010. Transmission of Little cherry virus -1 (LChV-1) by *Cuscuta europea* to herbaceous host plants. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, 272-274

**Jespersen, G. D. and Carter, G.** 1994. Little cherry virus survey in the Okanagan Valley of British Columbia. *Can. Plant Dis. Surv.*, 74: 117

**Katsiani, A. T., V. I. Maliogka, K. E. Efthimiou, N. I. Katis.** 2012. Partial characterization of a distinct Little cherry virus 1 isolate reveals high intraspecies genetic variability. Abstract from 22nd "International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops"(ICVF), Rome, June 3-8, 2012, 131

**Keim-Konrad, R. and Jelkmann, W.** 1996. Genome analysis of the 3'-terminal part of the little cherry disease associated dsRNA reveals a monopartite closterovirus-like virus. *Arch. Virol.*, 141: 1437-1451

**Komorowska, B. and Cieslinska, M.** 2004. First report of cherry virus A and little cherry virus-1 in Poland. *Plant Dis.*, 88: 909

**Lakotta, B.** 2000. Virenalarm im Alten Land. *Der Spiegel*, 17: 228-229

**Legrand, G., Verhoyen, M.** 1985. Détection du little cherry disease chez le cerisier par des observations au microscope à lumière U.V. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*, 50, 1283-1288

**Ludvikova, H., Sucha, J.** 2011. First report of Little cherry disease from sweet cherry (*Prunus avium*) and sour cherry (*P. cerasus*) in Czech Republic. *Plant Disease*, 95(9), p. 1197

**Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, D. T. et al.** 2005. Family *Closteroviridae*. p.1077-1087. In: Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. C. M. Fauquet, M. A. Mayo, F. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball, eds. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

**Matic, S., A. Myrta and A. Minafra.** 2007. First report of Little cherry virus 1 in cherry, plum, almond and peach in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 89 (3, Suppl.), S75-S75

- Matic, S., Minafra, A., Sanchez-Navarro, J. A., Pallas, V., Myrta, A. and Martelli, G. P.** 2009a. Kwanzan Stunting' syndrome: Detection and molecular characterization of an Italian isolate of Little cherry virus 1. *Virus Res.*, 143, 61-68
- Matic, S., Minafra, A., Boscia, D., da Cunha, A. T. P., Martelli, G. P.** 2009b. Production of antibodies to Little cherry virus 1 coat protein by DNA prime and protein boost immunization. *Journal of Virological Methods*, 155: 72-76
- Matic, S., A. Myrta and A. Minafra.** 2010. Detection of three Closteroviruses in stone fruit trees by Multiplex assays. *Journal of Plant Pathology*, 92 (1), 57-63
- Milbrath, J. A. and J. E. Reynolds.** 1964. The effect of four isolates of Little cherry virus on fruit size. *Plant Disease Reprtr.*, 48: 2, 124-126
- Nemeth, M.** 1986. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. Martinus Nijhoff Publishers and Akademiai Kiado, Budapest.
- Posnette, A. F.** 1965. Detection of little cherry virus in Europa. *Zast. Bilja*, 16: 431-434
- Raine, J., Weintraub, M. and Schroeder, B.** 1975. Flexuous rods and vesicles in leaf and petiole phloem of little-cherry diseased *Prunus* spp. *Phytopathology*, 65: 1181-1186
- Raine, J., Weintraub, M. and Schroeder, B. K.** 1979. Hexagonal tubules in phloem cells of little cherry-infected trees. *J. Ultrastruct. Res.*, 67: 109-116
- Raine, J., McMullen, R. D. and Forbes, A. R.** 1986. Transmission of the agent causing little cherry disease by apply mealybug *Phenacoccus aceris* and the dodder *Cuscuta lupuliformis*. *Can. J. Plant Pathol.*, 8: 6-11
- Rao, W. L., Li, F., Zuo, R. J., Li, R.** 2011. First report of Little cherry virus 2 in flowering and sweet cherry trees in China. *Plant Disease*, 95 (11), p. 1484
- Reeves, E. L., Cheney, P. W. and Milbrath, J. A.** 1955. Normal appearing Kwanzan and Shiro-fugen Oriental flowering cherries found to carry a virus of the Little cherry type. *Plant Dis.*, 39: 725-726
- Reeves, E. L. and Ph.W. Cheney.** 1956 Foliage symptoms on sweet cherry infected with the little-cherry-type virus obtained' from Kwanzan and Shiro-fugenoriental flowering cherries. *Plant Disease Reprtr.*, 40: 408-409
- Reeves, E. L. and Cheney, P. W.** 1963. Flowering cherries as symptomless hosts of Little cherry virus. *Phytopathol. Mediterr.*, 2: 184-190
- Rott, M. E. and Jelkmann, W.** 2001. Detection and partial characterization of a second closterovirus associated with little cherry disease, Little cherry virus-2. *Phytopathology*, 91: 261-267
- Rott, M. E. and Jelkmann, W.** 2005. Little cherry virus-2: Sequence and genomic organization of an unusual member of the Closteroviridae. *Arch. Virol.*, 150, 107-123
- Rybak, M., Kountrias, A., Eppler, A., Jelkmann, W., Heinze, C., and Adam, G.** 2004. Improvement of RT-PCR based detection of two closteroviruses associated with little cherry disease in sweet cherries. *J. Phytopathol.*, 152: 65-68
- Schröder, M., Petruschke, M.** 2010. Occurrence of Little cherry virus -1 on *Prunus* species in the state of Baden-Württemberg, Germany. 21st International Conference on virus and other graft transmissible diseases of fruit crops. Julius-Kühn-Archiv, 427, 268-271
- Tanaka, S., Hirose, K.** 1966. Indexing for Little cherry virus in Japanese flowering cherry. *Phytopath. Soc. Japan. Ann.*, 3: 23-25
- Theilmann, J., Mozafari, J., Reade, R., Wu, Z., Xie, W., Jesperson, G. et al.** 2002. Partial nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of Little cherry virus and development of an enzyme-linked immunosorbent assay-based diagnostic test. *Phytopathology*, 92: 87-98
- Theilmann, J., Orban, S. and Rochon, D.** 2004. High sequence variability among little cherry virus isolates occurring in British Columbia. *Plant Dis.*, 88: 1092-1098
- Ulubas Serçe C., M. Gazel and K. Çaglayan.** 2011. First report of Little cherry virus 1 in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 93, S4.63-S4.89
- Uyemoto, J. K. and Scott, S. W.** 1992. Important diseases of *Prunus* caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. *Plant Dis.*, 76: 5-11
- Vitushkina, M., Fechtner, B., Agranovsky, A. and Jelkmann, W.** 1997. Development of RT-PCR for the detection of little cherry virus and characterization of some isolates occurring in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.*, 103: 803-808
- Welsh, M. F., Cheney, P. W.** 1976. Little cherry. Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America. *Agriculture Handbook*, No. 437, p. 231-237. USDA, Agricultural Research Service, Washington DC, USA.
- Wilks, J. M., Milbrath, J. A.** 1956. Comparative studies of the virus diseases Western X little cherry and Little cherry. *Phytopath.*, 46, 596-9
- Wilks, J. M. and E. L. Reeves.** 1959. Flowering cherry - a source of Little cherry virus. *Phytopathology*, 50: 188-190
- Wilks, J. M., Stewart, J. A.** 1961. Response of Little cherry-infected cherry trees to zinc treatments. *Can. J. Plant Sci.*, 41: 517-522
- Wood, G. A.** 1993. Further investigations of the little cherry disease in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, Vol. 21: 39-14  
<http://healthyplants.wsu.edu/wp-content/uploads/2010/11/Little-cherry-fact>)