

## RAZNOLIKOST SLOVENSКИH IZOLATOV PPV (*PLUM POX VIRUS*)

Mojca VIRŠ EK MARN<sup>1</sup>, Irena MAVRI PLEŠKO<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup> Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

### IZVLE EK

Šarka, ki jo povzroča *Plum pox virus* (PPV), povzroča pri ob utljivih sortah koš i astih sadnih vrst znatno znižanje količine in kakovosti pridelka. V Sloveniji je razširjena v vseh pridelovalnih območjih jih koš i arjev in je ni mogoče več izkoreniniti. Izolati PPV so zelo variabilni in se združujejo v 7 razlikov, ki se razlikujejo po patogenosti, gostiteljskih rastlinah, zmožnosti in učinkovitosti prenosa z ušmi in zastopanosti v različnih geografskih območjih. Določitev vrste izolata je pomemben in odločilni korak za uspešno obvladovanje in omejevanje širjenja PPV. Za proučevanje populacije PPV v Sloveniji smo v letih 2011 in 2012 na 18 lokacijah zbrali 31 vzorcev koš i arjev. RT-PCR produkte, namnožene iz izolirane celokupne RNA posameznih vzorcev s pari za etnih nukleotidov P1/P3M ali P1/P3D smo sekvenirali. S pomočjo filogenetske analize slovenskih nukleotidnih zaporedij in nukleotidnih zaporedij iz baze NCBI GenBank dolžine 908 nt na N1b/CP regiji PPV genoma smo 16 slovenskih nukleotidnih zaporedij razvrstili v skupino PPV-Rec, 10 v PPV-M in 5 v PPV-D. PPV-Rec izolati smo potrdili na 14 vzorcih iz različnih kultivarjev sliv, enem vzorcu iz koreninskih izrastkov slive in enem vzorcu cibore. Okužbo s PPV-M izolati smo potrdili pri 3 breskvah, 2 marelicah in 5 slivah, okužbo s PPV-D izolati pa pri 3 marelicah in 2 slivah. Rezultati kažejo, da so v Sloveniji zastopani izolati iz skupin PPV-Rec, PPV-M in PPV-D in da so izolati PPV-Rec na slivah prevladujoči. Identiteta nukleotidnih zaporedij slovenskih izolatov je znašala od 83,7 do 100%. Znotraj posameznih skupin izolatov so slovenski izolati pokazali manjšo variabilnost. Identiteta nukleotidnih zaporedij slovenskih izolatov je bila najvišja znotraj skupine PPV-Rec (98,0 - 100%). Slovenski izolati znotraj PPV-M izolatov so pokazali 97,6 do 99,7% identiteta, medtem ko je identiteta slovenskih izolatov iz skupin PPV-D znašala od 96,1 do 99,4%.

**Ključne besede:** šarka, različni, izolati, nukleotidna zaporedja, filogenetske analize

### ABSTRACT

#### DIVERSITY OF SLOVENE PPV (*PLUM POX VIRUS*) ISOLATES

Sharka, caused by *Plum pox virus* (PPV), significantly reduces yield quality and quantity in susceptible stone fruit cultivars. In Slovenia, sharka is present in all stone fruit growing regions. PPV isolates are very diverse and have been assigned in 7 strains, which differ in their pathogenicity, host range, aphid transmissibility, and geographic distribution. Strain identification is thus an important and critical step in effective management and control of the spread of PPV. In order to study the population of PPV in Slovenia, 31 samples of stone fruits were collected from 18 locations in the years 2011 and 2012. Total RNA isolated from individual samples was used in RT-PCR using P1/P3M and P1/P3D primer pairs. Obtained amplicons were directly sequenced. Sequences of a 908 nt fragment corresponding to the N1b/CP region of Slovene isolates were compared with other sequences from the NCBI

<sup>1</sup> doc., dr. agr. znan., znanstvena svetnica, Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana

<sup>2</sup> dr. mikrobiol. znan., višja znanstvena sodelavka, prav tam

database using phylogenetic analyses. 16 Slovene sequences clustered with PPV-Rec isolates, 5 with PPV-D isolates and 10 with PPV-M isolates. PPV-Rec isolates were detected in 14 samples taken from plum cultivars, one sample from plum root suckers and one from *P. insititia*. Infection with PPV-M was found in 3 peach samples, 2 apricot samples and 5 plum samples, whereas PPV-D isolates were detected only in apricots (3 samples) and plums (2 samples). Results show that the three major PPV strains occur in Slovenia and that PPV-Rec is predominant in plums. Sequence identity of Slovene isolates ranged from 83,7 to 100 %. Higher identities were detected within each group of isolates. The highest identity of Slovene isolates was detected within PPV-Rec group (98,0 - 100%). The identity of Slovene PPV- M isolates ranged from 97,6 to 99,7% and of PPV-D isolates from 96,1 to 99,4%.

**Key words:** sharka, strains, isolates, sequences, phylogenetic analyses

## 1 UVOD

Šarka, ki jo povzroča *Plum pox virus* (PPV), je najnevarnejše virusno obolenje koš in astih sadnih vrst, predvsem breskev in marelic ter sliv in češelj. Pri zelo občutljivih sortah lahko okužba s PPV povzroči popolno izgubo pridelka in popoln propad dreves. Razen na količino vpliva okužba s PPV tudi na kakovost plodov. Plodovi z okuženih dreves so lahko drobnejši in vsebujejo manj sladkorjev in barvil, so brez okusa, kisli ali grenki. Taki plodovi so neuporabni za svežo porabo in za predelavo. Pogosto se zniža tudi skladišna sposobnost plodov (Snelling, 1997).

Izolati PPV so zelo variabilni. Razporejeni so v 7 različnih kov: PPV-M, PPV-D, PPV-Rec, PPV-EA, PPV-C, PPV-W in PPV-T (Szathmáry in Palkovics, 2010). Ti se razlikujejo med seboj v patogenosti, gostiteljskih rastlinah, zmožnosti in učinkovitosti prenosa z ušmi in navzočnosti v različnih geografskih območjih (James in Varga, 2005). Za uspešno obvladovanje in omejevanje širjenja PPV je zato zelo pomembno, da vemo, kateri različiki so razširjeni na pridelovalnem območju. V prispevku predstavljamo rezultate proučevanja populacije PPV v Sloveniji.

## 2 MATERIAL IN METODE

Podatki o vzorcih so prikazani v preglednici 1. Vzorce smo zbrali avtorji, del pa so jih poslali fitosanitarni inšpektorji. Za izolacijo celokupne RNA smo uporabili RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Nemčija) ali MagMax™-96 Total RNA Isolation Kit (Ambion, Teksas). Za obratno prepisovanje smo uporabili naključne začetne oligonukleotide, za verižno reakcijo s polimerazo (PCR) pa para začetnih oligonuklotidov P1/P3D (Wetzel *et al.*, 1991; Candresse *et al.*, 1998) in P1/P3M (Wetzel *et al.*, 1991; Candresse *et al.*, 1998). RT-PCR produkte smo sekvenirali (Macrogen, Nizozemska). Sekvence smo urejali in analizirali s pomočjo računalniškega programa BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999). Filogenetska drevesa smo sestavili s pomočjo programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2007).

Preglednica 1: Leto in lokacija vzor enja, vrsta in sorta vzor enega drevesa, razli ek in oznaka izolata v sliki 1.

Table 1: Year and location of sampling, species and variety of sampled trees, detrmned strain and name of the isolate in Figure 1.

| Leto | Lokacija                      | sadna vrsta | sorta               | razli ek | Oznaka izolata v sliki 1     |
|------|-------------------------------|-------------|---------------------|----------|------------------------------|
| 2011 | Maribor, vrt                  | marelica    | Boccuccia           | PPV-D    | marelica Boccuccia Maribor   |
| 2011 | Maribor, vrt                  | marelica    | Tyrinthos           | PPV-M    | marelica Tyrinthos Maribor   |
| 2011 | Maribor, vrt                  | sliva       | neznana             | PPV-M    | sliva Maribor                |
| 2011 | Maribor, vrt                  | sliva       | Doma a sliva        | PPV-D    | sliva Doma a Maribor         |
| 2011 | Domžale, vrt 1                | marelica    | neznana             | PPV-D    | marelica Domžale             |
| 2011 | Domžale, vrt 2                | sliva       | neznana             | PPV-Rec  | sliva Domžale                |
| 2011 | Domžale, vrt 2                | cibora      | neznana             | PPV-Rec  | cibora Domžale               |
| 2011 | Domžale, vrt 2                | breskev     | neznana             | PPV-M    | breskev Domžale              |
| 2011 | Mengeš, vrt                   | marelica    | neznana             | PPV-M    | marelica Mengeš              |
| 2011 | Šempeter <sup>1</sup> , vrt 1 | sliva       | neznana             | PPV-Rec  | sliva 1 Šempeter             |
| 2011 | Šempeter <sup>1</sup> , vrt 2 | sliva       | koreninski izrastki | PPV-Rec  | koreninski izrastki Šempeter |
| 2011 | Šempeter <sup>1</sup> , vrt 2 | sliva       | neznana             | PPV-Rec  | sliva 3 Šempeter             |
| 2011 | Šempeter <sup>1</sup> , vrt 2 | sliva       | neznana             | PPV-Rec  | sliva 4 Šempeter             |
| 2011 | Šempeter <sup>1</sup> , vrt 3 | sliva       | neznana             | PPV-M    | sliva 5 Šempeter             |
| 2011 | Šempeter <sup>1</sup> , vrt 3 | sliva       | neznana             | PPV-M    | sliva 6 Šempeter             |
| 2011 | Šempeter <sup>1</sup> , vrt 3 | sliva       | neznana             | PPV-Rec  | sliva 7 Šempeter             |
| 2011 | Šempeter <sup>1</sup> , vrt 4 | sliva       | neznana             | PPV-Rec  | sliva 8 Šempeter             |
| 2011 | Kromberk, vrt                 | sliva       | neznana             | PPV-Rec  | sliva Kromberk               |
| 2011 | Kamnik, nasad                 | sliva       | Stanley             | PPV-D    | sliva Stanley Kamnik         |
| 2011 | Vogrsko, nasad                | breskev     | neznana             | PPV-M    | breskev Vogrsko              |
| 2011 | Zemono, nasad                 | breskev     | neznana             | PPV-M    | breskev Zemono               |
| 2011 | Brkini, Huje                  | sliva       | President           | PPV-Rec  | sliva President Huje         |
| 2012 | Brkini, Podbeže, vrt          | sliva       | neznana             | PPV-Rec  | sliva 1 Podbeže              |
| 2012 | Brkini, Podbeže, vrt          | sliva       | neznana             | PPV-Rec  | sliva 2 Podbeže              |
| 2012 | Brkini, Podbeže, vrt          | sliva       | neznana             | PPV-Rec  | sliva 3 Podbeže              |
| 2012 | Brkini, Zavrhek, nasad        | sliva       | Brkinska sliva      | PPV-M    | sliva Brkinska Zavrhek       |
| 2012 | Brkini, Orehek, nasad         | sliva       | neznana             | PPV-Rec  | sliva Orehek                 |
| 2012 | Brkini, Slivje, nasad         | sliva       | Brkinska sliva      | PPV-Rec  | sliva Brkinska Slivje        |
| 2012 | Brkini, Slivje, nasad         | sliva       | Stanley             | PPV-M    | sliva Stanley Slivje         |
| 2012 | Brkini, Slivje, ob poti       | sliva       | sejanec             | PPV-Rec  | sliva sejanec Slivje         |
| 2012 | Stara Gora, nasad             | marelica    | Bergeron            | PPV-D    | Marelica Stara Gora          |

<sup>1</sup>Šempeter pri Novi Gorici

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Za filogenetske analize smo izbrali 908 baznih parov dolg del na Nib in CP regiji (nucleotidi 8506-9413 sekvence AY028309), ki nam je omogoil primerjavo slovenskih nukleotidnih zaporedij s številnim daljšimi, predvsem PPV-Rec nukleotidnimi zaporedji iz internetne baze NCBI GenBank. Na sliki 1 je prikazano filogenetsko drevo vseh slovenskih izolatov in izbranih izolatov PPV iz NCBI GenBank, izdelano s pomočjo metode povezovanja sosedov (Neighbor-joining) in testiranja ponovljivosti vozlika z 2.000 ponovitvami (bootstrap analysis with 2.000 replicates). Zaradi preglednosti niso prikazane vse izbrane sekvence. Uporaba drugih metod in vseh dosegljivih nukleotidnih zaporedij je dala podobne rezultate.

Slovenska nukleotidna zaporedja so v filogenetskem drevesu (Slika 1) razvrščena v skupino PPV-Rec, PPV-M ali PPV-D. PPV-Rec smo potrdili na 14 vzorcih iz raznih kultivarjev sliv, enem vzorcu iz koreninskih izrastkov slive in enem vzorcu cibore. Okužbo s PPV-M smo potrdili pri 3 breskvah, 2 marelicah in 5 slivah, okužbo s PPV-D pa pri 3 marelicah in 2 slivah.

Identiteta nukleotidnih zaporedij slovenskih izolatov je bila najvišja znotraj skupine PPV-Rec (98,0 - 100%). Slovenski izolati znotraj PPV-M izolatov so pokazali 97,6 do 99,7% identiteta, medtem ko je identiteta slovenskih izolatov iz skupine PPV-D znašala od 96,1 do 99,4%.

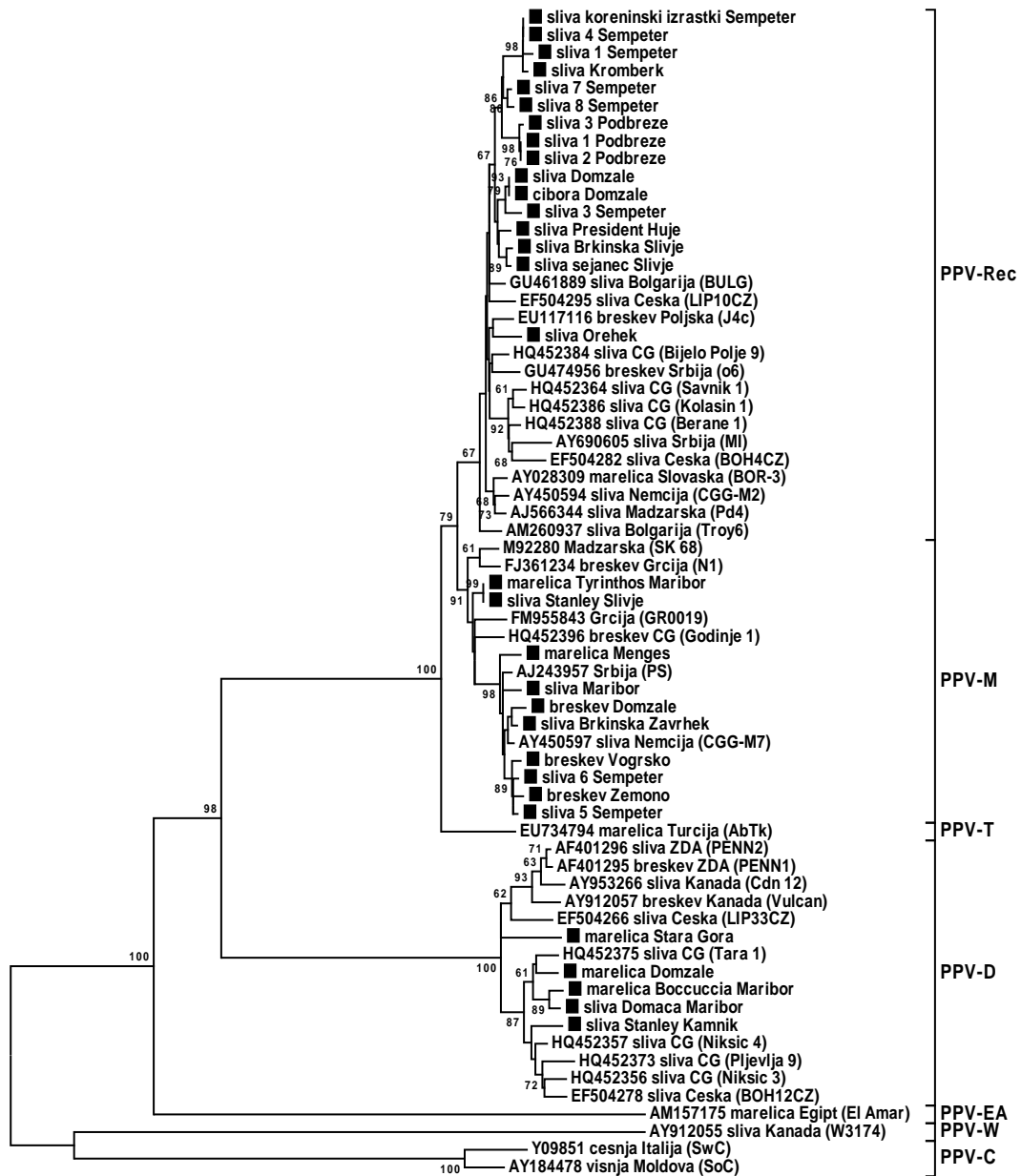
Slive v Sloveniji so okužene z različnimi PPV-Rec, PPV-M in PPV-D. Podobno so ugotovili tudi Matičin in sodelavci (2006) v Bosni in Hercegovini in Kajić in sodelavci (2008) na Hrvaškem, medtem ko so v Gori (Viršek Marn *et al.*, 2012) in Romuniji (Zagrai *et al.*, 2010) na slivah našli samo PPV-Rec in PPV-D. Na Češkem so v večini vzorcev našli PPV-Rec in PPV-D, le malo sliv pa je bilo okuženo s PPV-M (Gadiou *et al.*, 2008; Polák in Komínek, 2009). V okviru te raziskave je bila okužba z različnimi PPV-Rec na slivah prevladujoča. Nekoliko drugačni so bili rezultati raziskave, ki smo jo v letih 2005 in 2006 izvedli v okviru multilateralnega projekta. Za tipizacijo smo uporabili IC RT-PCR z različnimi specifičnimi za etnični oligonukleotidi. Sedem od 12 vzorcev sliv je bilo okuženih s PPV-M, eden s PPV-D in le trije s PPV-Rec v posamični okužbi. V enem vzorcu slive smo potrdili mešano okužbo s PPV-Rec in PPV-M. Mešano okužbo (PPV-M in PPV-D) smo razen tega našli tudi v vzorcu cibore.

Na breskvah smo v Sloveniji tako v prejšnji raziskavi kot v okviru multilateralnega projekta potrdili samo PPV-M. Breskve so lahko okužene tudi z različnimi PPV-D, PPV-Rec pa najdemo na breskvah le redko (Kamenova *et al.*, 2011) in večinoma v mešani okužbi (Dallot *et al.*, 2008).

Dallot *et al.* (2011) so ugotovili, da se nukleotidna zaporedja znotraj različnih PPV-M združujejo v dve podskupini, ki so ju poimenovali PPV-Ma in PPV-Mb. Ti dve podskupini najdemo tudi v okviru naše filogenetske analize. Nukleotidni zaporedji iz marelice Tyrinthos in slive Stanley iz Slivja sta razporejena v PPV-Ma (skupaj z izolatom GR0019 (FM955843) in N1 (FJ361234) iz Grčije in izolatom SK 68 iz Madžarske (M92280), ostala slovenska PPV-M nukleotidna zaporedja pa v podskupino PPV-Mb (skupina z izolatom CGG-M7 iz Nemčije (AY450597) in izolatom PS iz Srbije (AJ243957). Vsa nukleotidna zaporedja znotraj podskupine PPV-Ma so v raziskavi Dallot in sodelavcev (2011) izvirala iz mediteranskih držav (Francija, Italija, Ciper, Grčija), medtem ko so bili izolati razporejeni v PPV-Mb zbrani v centralni in vzhodni Evropi (Češka, Srbija, Slovaška, Bolgarija). PPV je bil v Slovenijo verjetno vnesen z razmnoževalnim materialom po dveh glavnih poteh in sicer iz nekdanjih republik SFRJ, pretežno iz Srbije ter iz zahodnoevropskih držav, predvsem Italije,

zato ni presenetljivo, da najdemo v Sloveniji tako izolate iz podskupine PPV-Ma kot PPV-Mb.

388



Slika 1: Filogenetsko drevo vseh slovenskih izolatov in izbranih izolatov PPV iz NCBI GenBank izdelano na osnovi 908 baznih parov dolgih nukleotidnih zaporedij na Nib in CP regiji (nukleotidi 8506-9413 izolata AY028309) s pomočjo metode povezovanja sosedov in testiranja ponovljivosti vozli a z 2.000 ponovitvami. Vrednosti ponovljivosti vozli a pri 2.000 ponovitvah, ki so nižje od 60, niso prikazane. Zaradi preglednosti v predstavljeno drevo niso vključeni številna nukleotidna zaporedja iz NCBI GenBank, ki so zelo podobna prikazanim. Nukleotidna zaporedja iz Slovenije so označena s črnimi kvadrati.

Figure 1: Phylogenetic tree of all Slovene PPV isolates (denoted by black squares) and selected PPV isolates from NCBI GenBank, reconstructed from 908 nt fragment corresponding to Nib(C-ter)/CP(N-ter) (nucleotides 8506-9413 of the isolate AY028309) by Neighbor-joining method. Trees were bootstrapped with 2.000 replicates. Only bootstrap values over 60% are shown. In order to keep the tree of a manageable size, several sequence variants from NCBI GenBank that are highly similar to the ones used were not included in this representation.

Znotraj PPV-D je ve in slovenskih nukleotidnih zaporedij v podskupini skupaj s mnogorskimi nukleotidnimi zaporedji in nukleotidnimi zaporedji najdenimi na eškem na slivah, ki so bile že okužene pri uvozu iz Srbije (Gadiou *et al.*, 2008). Lahko torej domnevamo, da je izvor okužb sliv in nekaterih marelic v Sloveniji na Balkanu. Nukleotidno zaporedje izolata PPV, najdenega na marelici Bergeron iz Stare Gore pri Novi Gorici, se razporeja izven skupin z visoko vrednostjo ponovljivosti vozli a (bootstrap value). Razmnoževalni material te sorte je iz Avstrije, ne vemo pa, ali je bil okužen že ob sajenju leta 2008 ali pa so okužbo iz okolice prenesle uši.

Znotraj skupine PPV-Rec se slovenski izolati ve inoma razporejajo skupaj, vendar imajo skupine znotraj PPV-Rec z izjemo skupine PPV izolatov slovenskih sliv iz jugozahodne Slovenije (vrednosti ponovljivosti vozli a 86%) in sliv iz rne Gore, Srbije in eške (vrednosti ponovljivosti vozli a 92%) dokaj nizke vrednosti ponovljivosti vozli a.

Povzamemo lahko, da se ve in slovenskih nukleotidnih zaporedij znotraj posameznih razli kov razporeja skupaj, posamezni izolati pa kažejo ve je razlike in so razporejeni lo eno od drugih slovenskih nukleotidnih zaporedij. Razporejanje slovenskih izolatov znotraj in med posameznimi razli ki ve inoma ni v povezavi z rastiš em niti z gostiteljsko rastlino ampak najverjetneje z izvorom okužbe. Tako sta npr. dve marelici iz vrta v Mariboru okuženi vsaka s svojim razli kom PPV. V istem vrtu rasteta le nekaj metrov narazen sliva, okužena s PPV-Mb in marelica, okužena z razli kom PPV-Ma. Podobno sta dve slivi iz istega vrta v Šempetru pri Novi Gorici okuženi z razli kom PPV-M, ena pa s PPV-Rec. Glede na zelo razli en izvor razmnoževalnega materiala, ki je na voljo v Sloveniji, ti rezultati niso presenetljivi.

389

#### 4 SKLEPI

Ugotovili smo, da so v Sloveniji zastopani izolati iz skupin PPV-Rec, PPV-M in PPV-D . Na breskvah najdemo samo razli ek PPV-M. V Sloveniji najdemo izolate iz podskupine PPV-Ma in podskupine PPV-Mb.

#### 5 ZAHVALA

Delo je bilo izvedeno predvsem v okviru CRP projekta V4-1102 z naslovom »Reševanje problematike ustaljenih karantenskih boleznih sadnih vrst *Prunus* spp. za ohranitev pridelave«, ki ga financirata Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS in Ministrstvo za kmetijstvo in okolje RS. Del sredstev je bil zagotovljen v okviru programske skupine Trajnostno kmetijstvo (P4-0133), ki ga financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS. Del vzorcev je bil zbran v okviru posebnega nadzora šarke, ki ga financira Ministrstvo za kmetijstvo in okolje RS.

#### 6 LITERATURA

- Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J.B., Dunez, J. 1998. Comparison of monoclonal antibodies and PCR assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of *Plum Pox Potyvirus*. *Phytopathology*, 88:198-204.
- Dallot, S., Glasa, M., Pittnerova, S., Paunovi , S., Jevremovi , D., Kamenova, I., Kominek, P., Virscek-Marn, M., Mavric Plesko, I., Milusheva, S. 2008. Prevalence and genetic structure of PPV-M in six European countries. *Acta Horticulturae*, 781: 227-234.
- Dallot, S., Glasa, M., Jevremovi , D., Kamenova, I., Paunovi , S., Labonne, G. 2011. Mediterranean and central-eastern European countries host viruses of two different clades of plum pox virus strain M. *Archives of Virology*, 156: 539-542.
- Gadiou, S., Safárová, D., Navrátil, M. 2008. Genetic variability of *Plum pox virus* isolates in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 513-517.

- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- James, D., Varga, A., 2005. Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: Evidence of a new strain. *Virus Research*, 110: 143–150.
- Kaji, V., Cerni, S., Krajacic, M., Mikec, I., Škoric, D. 2008. Molecular typing of *Plum pox virus* isolates in Croatia. *Journal of Plant Pathology*, 90, 1: S1.9-S1.13.
- Kamenova, I., Dallot, S., Bozkova, V., Milusheva, S. 2011. First report of the *Plum pox virus* recombinant strain on peach in Bulgaria. *Plant Disease*, 95: 1320–1321.
- Marti, S., Al-Rwahnih, M., Myrta, A. 2006. Diversity of *Plum pox virus* isolates in Bosnia and Herzegovina. *Plant Pathology*, 55: 11-17.
- Polák, J., Komínek, P. 2009. Distribution of *Plum Pox Virus* Strains in Natural Sources in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 45, 4: 144-147.
- Snelling, C. 1997. The plum pox (sharka) virus disease in Europe. <http://www.hortnet.co.nz/publications/science/s/snelling/sharka.htm> (6.2.2012).
- Szathmáry, E., Palkovics, L. 2010. Natural deletion is not unique in the coat protein (CP) of recombinant *Plum pox virus* (PPV) isolates in Hungary. *Julius-Kühn-Archiv*, 427: 151-155.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- Viršcek Marn, M., Mavric Plesko, I., Zindovic, J., Miladinovic, Z. 2012. Diversity of *Plum pox virus* isolates in Montenegro. *Journal of Plant Pathology*, 94, 1: 201-204.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Dunez, J. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355-365.
- Zagrai, I., Zagrai L., Preda, S., Kelemen, B., Petriccele, I., Popescu, O., Pamfil, D., Isac, M. 2010. Genetic diversity of *Plum pox virus* isolates in Muntenia, Romania. *Romanian Biotechnological Letters*, 15, 3: 5303-5309.