



A.F. 138328



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias biológicas, Oceanicas y Recursos Naturales
Centro de Información Bibliotecaria

No. DE INVENTARIO: D-76601
VALOR: 0.00
CLASIFICACIÓN: 581/1402
FECHA DE INGRESO:
PROCEDENCIA:
SOLICITADO POR:

Análisis de diversidad genética del *Cucumber mosaic virus* (CMV) en plantas de cultivo de la costa ecuatoriana.

FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA

CARLOS A. MORA PINARGOTE
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
2015

NO EXISTE
REPETIDA

D-76601

Análisis de diversidad genética del *Cucumber mosaic virus* (CMV) en plantas de cultivo de la Costa Ecuatoriana

Carlos Alberto Mora Pinargote^a & Diego Fernando Quito Ávila^b

^aFacultad de Ciencias de la Vida, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador
caramora@espol.edu.ec

^bCentro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador
diego.quito.avila@gmail.com

Resumen. El *Cucumber mosaic virus* (CMV) posee una distribución global y un amplio número de hospederos. Debido a la carencia de información en enfermedades de tipo viral en Ecuador, la propagación de estos patógenos ha sido difícil de controlar. Sin embargo, en los últimos años estudios han reportado diferentes especies virales infectando a varios cultivos. El objetivo de este estudio fue identificar las diferentes cepas de CMV presentes en el país, y la diferente sintomatología encontrada en campo según la cepa viral, en caso de que esta exista. Los análisis filogenéticos y de secuencias de CMV infectando cultivos revelaron la presencia del CMV subgrupo I y sus dos serotipos IA y IB, siendo de mayor prevalencia el CMV IA en Ecuador y en los diferentes países de América donde se ha reportado CMV.

Palabras Claves: CMV, cápside proteica, RT-PCR, análisis filogenético, Ecuador.

Abstract. *Cucumber mosaic virus* (CMV) has a worldwide distribution and a wide number of plant host. Due to the lack of information of viral diseases in Ecuador, the spread of these pathogens have been hard to control. However, in the last years, it have been reported several viral species infecting different crops. The aim of this study was to identify the different strain of CMV present in the country, and the differences between symptoms and strains, if it exist. Sequence and phylogenetic analyses of CMV infecting crops have shown the presence of CMV subgroup I and its two serotypes IA and IB, with more prevalence of CMV IA in Ecuador and the different American countries that have reported CMV.

1. Introducción.

En promedio se estima que a nivel mundial del 10% al 15% (USD\$ 64 billones) de las pérdidas de cultivos son causadas por infecciones virales, siendo más propensas las regiones tropicales y subtropicales [1, 2]. En cultivos de gran relevancia mundial, donde podemos incluir, banano, cacao, maíz el porcentaje de pérdida puede alcanzar los 30% - 40% siendo un problema importante para el productor [2].

En el Ecuador, siendo la agricultura, la generadora del 9.4% del PIB total según datos de El Banco Mundial y el INEC¹ (2013), posee un escaso conocimiento acerca de las cepas virales presentes en el territorio. Sin embargo, en los últimos años estudios enfocados en la detección de estos patógenos ha

demostrado la presencia de géneros virales como Potivirus, Umbravirus [3], Ampelovirus [4], Comovirus [5], Cucumovirus [6], anteriormente desconocidos, infectando cultivos.

Una de las cuatro especies dentro del género Cucumovirus es el *Cucumber mosaic virus* (CMV), especie listada dentro del puesto número 4 de los virus de plantas con mayor importancia económica [7], y uno de los patógenos virales con más hospederos, calculando alrededor de 1000 especies de plantas, donde se incluyen plantas dicotiledóneas, monocotiledóneas, arbustos y árboles [8 - 13]; reportado en varias partes del mundo [8] y recientemente en el Ecuador [6]. Es transmitido por al menos 75 especies de áfidos [9], pudiendo también ser transmitido, aunque en menor porcentaje (bajo el 2.5%), por semillas [12]. Su genoma comprende tres cadenas simples de ARN con CAP (ARN1, ARN2 y ARN3) y cinco Marcos Abierto de Lectura (Open Reading Frames - ORFs) (Fig. 1) [9, 12, 14]. Los ORFs 1a y 2a son codificados por el ARN1 y ARN2 respectivamente, son componentes virales de la replicasa [12]. El ORF 2b, un gen sobrepuesto al ORF 2a, es expresado a partir de un ARN sub-genómico, ARN 4a, que codifica a un supresor de silenciamiento genético post-transcripcional [15, 16]. El ARN3 codifica a la proteína 3a, la proteína de movimiento, y la cápside proteica (CP), este último expresado por un sub-genoma ARN4. Ambos requeridos para el movimiento del virus [9, 14]. Además se ha detectado la presencia de un quinto ARN no codificante, un ARN satélite (satARN), que puede tener efectos drásticos en la inducción de síntomas, que van desde la atenuación [17] hasta el empeoramiento de los mismos [18]. Se ha llegado a demostrar que el satARN puede inducir a la muerte celular programada en tomate, conduciendo a la necrosis sistemática y eventualmente a la muerte de la planta [19].

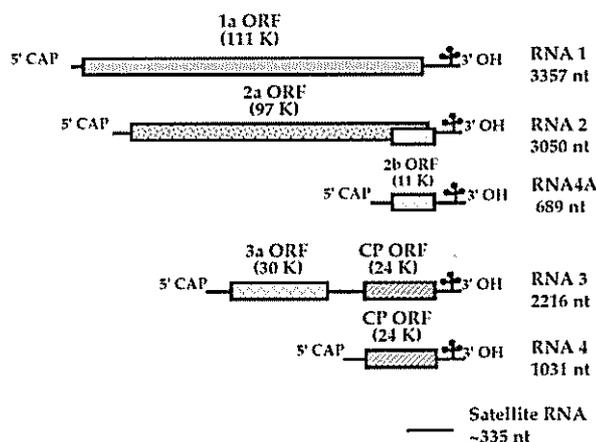


Figura 1. Organización genómica del CMV. [16]

Las cepas de CMV han sido clasificadas dentro de dos subgrupos: I y II, basados en sus propiedades biológicas y serológicas y pruebas de hibridación de ácidos nucleicos [9, 13] siendo el subgrupo I más heterogéneo que el subgrupo

II [10]. Análisis adicionales a las secuencias del gen de la CP y de la región no-traducible 5' (NTR 5') del ARN3 ha llevado a la división del subgrupo I en IA y IB con 92 – 95% de similitud entre estos dos subgrupos [20]. La existencia de diferentes cepas se relaciona a la naturaleza de los virus de ARN, a causa de la ausencia de la habilidad de corrección de errores de la ARN replicasa [21], son capaces de generar rápidamente cambios genéticos, y mutaciones aleatorias, siendo la recombinación la principal fuente de evolución viral y variabilidad [22, 23], proveyendo al virus la facilidad de evolucionar y adaptarse a las presiones de selección [23 – 25]. Se ha demostrado también que el satARN puede ser una fuente adicional de variabilidad [26] en poblaciones virales con ausencia o presencia del satélite.

De esta manera, debido al reciente descubriendo de la presencia del CMV en el Ecuador [6] y a la nula información que existe en el país con respecto a la expresión de la enfermedad (síntomas) y a los cultivos a los cuales se encuentra afectando, se hace evidente la necesidad de estudios que determinen la diversidad genética, en comparación con las registradas en Sur América y el mundo; así mismo, la posible existencia de una relación entre sintomatología a nivel de campo y cepa viral encontrada. Esperando que este estudio sea de mucha ayuda al conocimiento y al desarrollo de estrategias de control de enfermedades causadas por este agente infeccioso.

2. Metodología.

Recolección de muestras y registro fotográfico: Se recorrieron sectores de cultivos de ciclo corto dentro de las provincias de El Guayas, El Oro y Manabí, en donde se recolectó hojas infectadas mostrando síntomas usualmente atribuidos al CMV como: mosaicos, crecimiento retrasado de la planta, rayas cloróticas, distorsión de las hojas y necrosis de la hoja bandera [12, 13]. Alrededor de 80 hojas de diferentes cultivos, en donde se incluye tomate, banano, pimiento, malezas, zapallo, sandía y pepino fueron recolectadas mostrando los síntomas previamente indicados. Las muestras fueron clasificadas según sus síntomas, fotografiadas y asignadas con un número para su identificación.

Extracción de RNA viral, RT-PCR y Secuenciación. El ARN total de cada una de las hojas infectadas fue extraído como describe Halgren *et al.* (2007) [27]. El RNA extraído fue usado para la síntesis de cADN usando iniciadores aleatorios. La Reacción en Cadena de la Polimerasa fue llevada a cabo con iniciadores específicos para el gen de la cápside proteica (CP) diseñados por Khan (2011).

La reacción de 10 μ l contiene 1 μ l 10x PCR Buffer, 0.2 μ l de cada iniciador (40 μ M), 0.2 de 10mM dNTPs, 2 μ l cDNA, 6.275 μ l de agua grado biología molecular y 0.1 μ l de Taq DNA Polimerasa (Genescript, USA). Los parámetros para la PCR fueron los siguientes: 94°C por 4min, 40 ciclos de 94°C por 45s, 55°C por 45s y 72°C por 45s, y un tiempo de elongación final de 10min a 72°C. El producto amplificado (10 μ l) fue separado en un gel de agarosa al 2% con un

marcador de peso molecular de 100bp en un buffer TAE 1x por electroforesis a 100V por 40min.

Se preparó reacciones de 25µl de las muestras positivas conteniendo 2.5µl de 10x PCR Buffer, 0.5µl de cada iniciador (40µM), 0.5 de 10mM dNTPs, 3µl cADN, 18.5µl de agua grado biología molecular y 0.15 de Taq ADN Polimerasa (Genescript, USA) con los siguientes parámetros en el termociclador: 94°C por 4min, 40 ciclos de 94°C por 45s, 55°C por 45s y 72°C por 45s, y un tiempo de elongación final de 10min a 72°C; 5µl del producto final amplificado (25µl) fueron cargados en un gel de agarosa al 2% con un marcador de peso molecular de 100bp en un buffer TAE 1x por electroforesis a 100V por 40min para la comprobación de los positivos.

El producto de amplificación final (20µl) fue secuenciado usando los mismos iniciadores específicos (1µl). El secuenciamiento fue realizado por Macrogen (<http://www.macrogen.com/eng>), Rep. de Corea.

Análisis de las secuencias y estudio filogenético. Las secuencias fueron analizadas mediante el programa de bioinformática Geneious V.8.1.7 en donde segmentos iniciales y/o finales fueron eliminados apropiadamente para la obtención de un análisis "limpio". Las secuencias fueron comparadas y alineadas con otras reportadas en diferentes parte del mundo pertenecientes a los diferentes subgrupos [I (A y B) y II] encontradas en la base de datos de NCBI. Las relaciones filogenéticas (Neighbor – Joining) fueron inferidas utilizando las secuencias disponibles, usando como secuencia raíz dos especies diferentes del mismo género Cucumovirus, *Tomato aspermy virus* [EF153735] y *Peanut stunt virus* [NC002040] [28], para mejorar la formación del árbol filogenético. El método estadístico de *bootstrap* fue usado para el soporte de cada nodo.

3. Resultados.

Recolección de muestras. Los síntomas mayormente encontrados en los diferentes cultivos (tomate, banano, zapallo, pepino, pimiento) presentaban mosaicos, rayas cloróticas, distorsión de las hojas y en algunos casos la planta no crecía igual que a las de su alrededor, como en el caso de los cultivos de pimiento, en donde el porcentaje de incidencia era aproximadamente del 90% (Fig. 2); en el caso de pepino el cultivo se había perdido por completo y fueron escasas las muestras que se pudieron recolectar. Alrededor de 80 hojas de diferentes plantas pertenecientes a las provincias de El Guayas, Manabí y El Oro fueron recolectadas para el análisis.

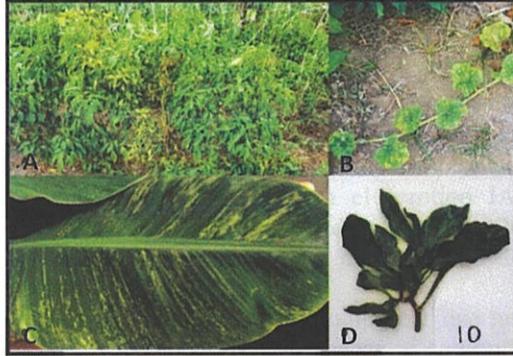


Figura 2. Sintomatología encontrada. **A.** Plantación de pimiento con gran afectación viral. **B.** Planta de pepino mostrando mosaico en sus hojas. **C.** Rayas cloróticas en hojas de banano. **D.** Pimiento con clorosis y deformación en sus hojas (registro fotográfico realizado en el laboratorio).

RT-PCR. La amplificación del gen de la cápside proteica resulto en un amplicon de aproximadamente ~657bp para las muestras infectadas por CMV, incluyendo el control positivo, no se observó ninguna banda en el control de reacción (Fig. 3). En total se procedió a la purificación del producto de PCR de 15 muestras positivas lista para la secuenciación.

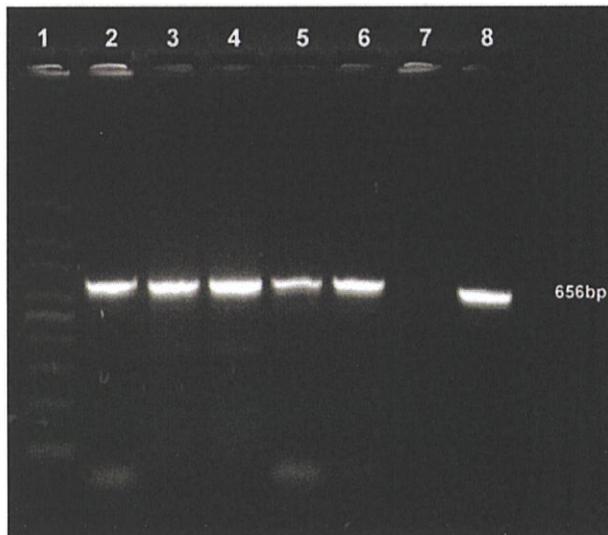


Figura 3. Gel de agarosa al 2% con los productos amplificados de la cápside proteica mediante RT-PCR.

Columna 1: Marcador molecular de 100bp.

Columna 2 – 6: Ban1.10: Banano – El Oro; BanBG: Banano – Guayas; Pep26G: Pepino – Guayas; Pto10G: Pimiento – Guayas; Pto11G: Pimiento - Guayas.

Columna 7: Control negativo.

Columna 8: Control positivo.

Análisis de secuencias y estudio filogenético. El análisis se basó en un fragmento de 630nt de CP de 5 muestras independientes que incluyeron banano, pepino y pimienta. El alineamiento múltiple demostró que las secuencias obtenidas en este estudio alcanzan un máximo de identidad del 75% y 98% con aislados del subgrupo II y subgrupo I, respectivamente. Dentro de este último subgrupo las secuencias pertenecientes a CMV infectando a banano (BanBG, Ban1.10) muestran una mayor identidad con el serotipo IA (95 – 98%), mientras que las pertenecientes a CMV infectando pepino (Pep26G) y pimienta (Pto10G, Pto11G) poseen una mayor identidad con serotipos del subgrupo IB (93% - 97%) (Tabla I).

Al realizar un árbol filogenético, se pudo comprobar que nuestros aislados ecuatorianos Pep26G, Pto10G y Pto11G pertenecen al subgrupo IB; mientras que BanBG y Ban1.10 son más cercanos a aislados pertenecientes al subgrupo IA.

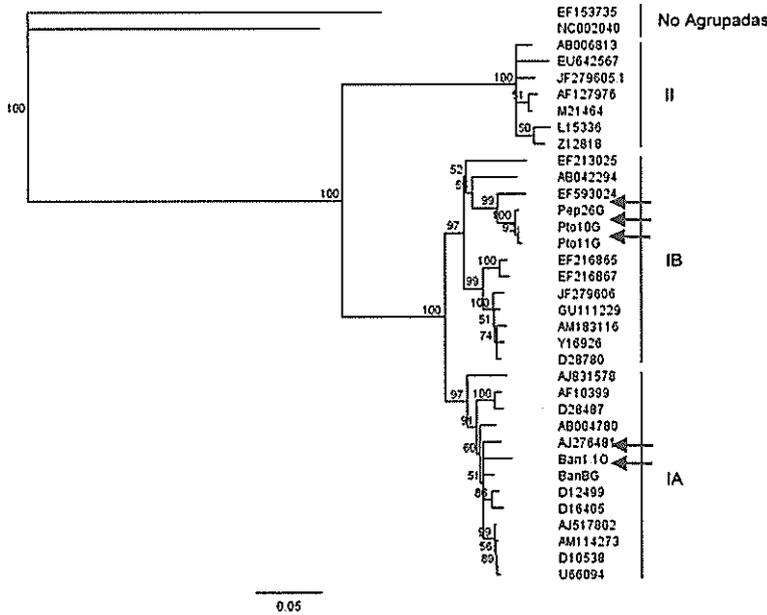


Figura 4. Árbol filogenético, generado por el método de construcción Neighbor-Joining y modelo de distancia genética Tamura-Nei (Método estadístico *bootstrap* con 100 réplicas) en Gencious R8 usando como secuencias raíz EF153735 y NC002040. La relación filogenética ilustrada a partir del alineamiento múltiple de varias secuencias del gen de la cápside proteica del ARN3 del *Cucumber mosaic virus*. Las secuencias fueron obtenidas del NCBI, los códigos de acceso se muestran en cada rama del árbol. Las secuencias analizadas (Pepino: Pep26G; Pimiento: Pto10G, Pto11G; Banano: Ban1.10; BanBG) en este estudio se encuentran indicadas en flechas rojas.

Tabla 1. Comparación de las secuencias del gen de la cápside proteica (% de identidad) analizadas en el estudio con secuencias disponibles en el NCBI separados en sus diferentes subgrupos (5 secuencias escogidos por subgrupo). Tabla generada en Geneious R8.

	CMV Subgrupo II					CMV Subgrupo IA					CMV Subgrupo IB					Secuencias Analizadas				
	AB006813	L15336	EI642557	M21464	Z12818	AF10399	AM14273	D10538	D28487	U66094	AB04294	D28780	EF593024	F779606	Y18206	Ban110	Ban86	Pept26G	Pro10G	Pro11G
CMV Subgrupo II	AB006813	97.2	95.2	98.0	97.6	73.8	73.7	73.6	73.6	73.4	72.4	73.5	72.1	73.5	73.1	74.6	73.4	76.1	76.1	76.3
	L15336	97.2		95.7	97.6	73.5	73.2	73.1	73.5	72.9	72.0	73.2	71.9	73.2	72.9	73.8	74.9	75.2	75.1	75.4
	EI642557	95.2	95.7		94.9	72.8	72.5	72.9	72.9	72.3	71.7	72.8	71.8	72.9	72.6	73.2	73.7	75.0	75.3	75.6
	M21464	98.0	96.6	94.9		73.6	73.3	73.3	73.4	73.1	72.4	73.4	72.0	73.4	73.1	74.3	75.0	76.3	76.2	76.5
	Z12818	97.6	97.6	97.4	97.0		73.5	73.1	73.0	73.6	72.8	72.3	73.2	72.1	73.3	73.8	74.6	75.8	76.1	76.3
CMV Subgrupo IA	AF10399	73.8	73.5	72.8	73.6	73.5		96.8	96.5	96.5	96.3	90.1	91.4	89.1	90.9	95.1	96.8	90.6	90.8	90.6
	AM14273	73.7	73.2	72.5	73.3	73.1	96.8		99.3	96.2	99.1	90.6	91.9	89.5	91.4	96.7	97.8	92.1	91.9	91.7
	D10538	73.6	73.1	72.5	73.3	73.0	96.5	99.3		96.0	99.7	90.4	91.6	89.3	91.2	96.8	97.8	92.2	92.0	91.9
	D28487	73.6	73.5	72.9	73.4	73.6	98.5	96.2	96.0		95.8	89.9	91.2	89.9	90.8	94.8	96.2	90.5	90.6	90.5
	U66094	73.4	72.9	72.3	73.1	72.8	96.3	99.1	98.7	95.8		90.2	91.5	89.0	90.9	96.5	97.7	92.1	91.9	91.7
CMV Subgrupo IB	AB04294	72.4	72.0	71.7	72.4	72.3	90.1	90.6	90.4	89.9	90.2		93.1	92.6	92.3	88.7	89.5	92.7	92.8	92.7
	D28780	73.5	73.2	72.8	73.4	73.2	91.4	91.9	91.6	91.2	91.5	93.1		92.7	98.3	90.4	90.9	93.3	93.2	93.0
	EF593024	72.1	71.9	71.8	72.0	72.1	89.1	89.5	89.3	88.9	89.0	92.6	92.7		90.6	87.7	87.7	96.5	96.7	96.5
	F779606	73.5	73.2	72.9	73.4	73.3	90.9	91.4	91.2	90.8	90.9	92.3	98.3	92.6		91.2	91.1	93.2	93.0	92.9
	Y18206	73.1	72.9	72.6	73.1	73.0	90.7	91.3	91.2	90.6	90.9	92.3	98.5	93.1	97.9	90.3	90.3	93.6	93.5	93.3
Secuencias Analizadas	Ban110	74.6	73.8	73.2	74.3	73.8	95.1	96.7	96.8	94.8	96.5	88.7	90.4	87.7	91.2	97.2	97.2	90.9	90.7	90.5
	Ban86	75.4	74.9	73.7	75.0	74.6	96.8	97.8	97.8	96.2	97.7	89.5	90.9	87.7	91.1	97.2	91.8	91.8	91.6	91.3
	Pept26G	76.1	75.2	75.0	76.3	75.8	90.6	92.1	92.2	90.5	92.1	92.7	93.3	96.5	93.2	90.9	91.8	91.8	98.5	99.4
	Pro10G	76.1	75.1	75.3	76.2	76.1	90.8	91.9	92.0	90.6	91.9	93.8	93.2	96.7	93.0	90.7	91.6	99.5	99.5	99.8
	Pro11G	76.3	75.4	75.6	76.5	76.3	90.6	91.7	91.9	90.5	91.7	92.7	93.0	96.5	92.9	90.5	91.3	99.4	99.4	99.8

4. Discusión.

El alto índice de mutación en virus de ARN, así como el reordenamiento y recombinación en casos de virus con genomas segmentados, pueden resultar en la emergencia de aislados con mayor virulencia que dificultan su manejo a nivel de campo [22, 29]. Considerando que CMV es un virus cosmopolita con un amplio rango de hospederos, se hace necesaria la caracterización de aislados presentes en zonas costeras agrícolas de nuestro país. El presente estudio se basó en el análisis del gen de la cápside proteica, el cual juega un rol importante en la transmisión y modulación de la replicación [21]. Los resultados demostraron la presencia de los dos serotipos reportados dentro del subgrupo I. Especies de CMV IA poseen una distribución global, mientras que las cepas IB se encuentran mayormente distribuidas en Asia [20]. Sin embargo se ha detectado presencia de este serotipo en otras regiones como Italia [30], Estados Unidos [22] y Brasil [31]; y ahora en nuestro país, encontrado solo infectando a banano. Estudios demuestran a la cepa IB infectando mayormente a banano [21], por lo que se sugiere que los diferentes serotipos infectan a cultivos específicos. En cuanto a la sintomatología encontrada en relación con las cepas, era más común observar rayas cloróticas en banano (CMV IB) y síntomas de mosaicos en pepino y pimiento (CMV IA). En ambos casos la planta presentaba necrosis, y existía una diferencia en la gravedad de los síntomas, ya que las plantas de banano tenían mayor dificultad en desarrollarse y producir frutos que las plantaciones de pimiento, las cuales podían producir sin problemas, caso no observado en las plantaciones de pepino infectado con CMV IA. Esto se asume sin tomar en cuenta las diferencias fisiológicas de cada planta.

Al igual que lo reportado en otros países de América [24, 31], en el Ecuador existe prevalencia de CMV IA, y aún no se ha reportado la presencia de CMV II.

5. Conclusión.

Este trabajo registra por primera vez en el Ecuador la presencia de los dos serotipos CMV I (CMV IA y CMVIB) infectando a plantaciones de pimiento, pepino y banano. Se hace evidente la importancia de conocer más sobre los patógenos que pueden estar infectando a plantaciones y sus vectores de transmisión para poder tener un control adecuado, beneficiando así a los productores. A pesar de la sintomatología descrita para cada cepa viral, se recomienda realizar más estudios referentes a este tema, ya que existen otros factores que influyen en la expresión de los síntomas, citando por ejemplo los satARN virales y la fisiología de cada planta.

6. Referencias.

- [1] J. A. Tomlinson, "Epidemiology and control of virus diseases of vegetables," *Ann. Appl. Biol.*, vol. 110, no. 3, pp. 661–681, Jun. 1987.
- [2] G. Loebenstein, "Plant Virus Diseases: Economic Aspects," in *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*, 2009, pp. 171–176.

- [3] D. F. Quito-Avila, R. A. Alvarez, M. A. Ibarra, and R. R. Martin, "Detection and partial genome sequence of a new umbra-like virus of papaya discovered in Ecuador," *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 143, no. 1, pp. 199–204, Sep. 2015.
- [4] D. F. Quito-Avila, M. A. Ibarra, R. A. Alvarez, L. Espinoza, M. F. Ratti, E. L. Peralta, and R. R. Martin, "First Report of Raspberry bushy dwarf virus in Andean Blackberry (*Rubus glaucus*) in Central Ecuador," *Plant Dis.*, vol. 97, no. 7, pp. 1003–1003, Jul. 2013.
- [5] R. A. Alvarez, R. R. Martin, and D. F. Quito-Avila, "First report of Pineapple mealybug wilt associated virus-1 in Ecuador," *New Dis. Reports*, vol. 31, p. 15, Apr. 2015.
- [6] L. D. R. Espinoza Lozano, E. L. Peralta García, J. R. Paredes Montero, and R. Alvarez, "Determinación de Géneros y Especies Virales que se encuentran afectando a las Cucurbitáceas en la Zona de Pedro Carbo, Provincia del Guayas," *Rev. Tecnológica-ESPOL*, vol. 23, no. 1, pp. 33–40, 2011.
- [7] E. P. Rybicki, "A Top Ten list for economically important plant viruses A Top Ten List For Economically-Important Plant Viruses," *Arch. Virol.*, no. August, 2015.
- [8] J. R. Edwardson and R. G. Christie, "Cucumoviruses," in *CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes*, Boca Raton, Florida.: CRC Press, 1991, pp. 293 – 319.
- [9] P. Palukaitis, M. J. Roossinck, R. G. Dietzgen, and R. I. Francki, "Cucumber mosaic virus," *Adv. Virus Res.*, vol. 41, pp. 281–348, Jan. 1992.
- [10] P. Palukaitis and F. García-Arenal, "Cucumoviruses," *Adv. Virus Res.*, vol. 62, pp. 241–323, 2003.
- [11] F. García-Arenal and P. Palukaitis, "Cucumber Mosaic Virus," in *Encyclopedia of Virology*, Elsevier, 2008, pp. 614–619.
- [12] M. Jacquemond, "Cucumber Mosaic Virus," in *Advances in virus research*, 1st ed., vol. 84, Elsevier Inc., 2012, pp. 439–504.
- [13] L. María, L. Duarte, E. B. Rivas, R. Harakava, M. Cristina, D. Veauvy, M. Amelia, and V. Alexandre, "Genealogy of Cucumber mosaic virus Isolated from Ornamental Species," vol. 2013, no. May, pp. 1081–1087, 2013.

- [14] T. Canto, K. Hellwald, K. J. Oparka, and P. Palukaitis, "Characterization of Cucumber Mosaic Virus," vol. 248, no. 237, pp. 237–248, 1997.
- [15] S. W. Ding, B. J. Anderson, H. R. Haase, and R. H. Symons, "New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome.," *Virology*, vol. 198, no. 2, pp. 593–601, 1994.
- [16] M. J. Roossinck, "Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution," *Mol. Plant Pathol.*, vol. 2, no. 2, pp. 59–63, Mar. 2001.
- [17] K. Yoshida, T. Goto, and N. Iizuka, "Attenuated isolates of cucumber mosaic virus produced by satellite RNA and cross protection between attenuated isolates and virulent ones.," *Japanese J. Phytopathol.*, vol. 51, no. 2, pp. 238–242, 1985.
- [18] J. M. Kaper and H. E. Waterworth, "Cucumber mosaic virus associated RNA 5: causal agent for tomato necrosis.," *Science*, vol. 196, no. 4288, pp. 429–31, Apr. 1977.
- [19] P. Xu and M. J. Roossinck, "Cucumber mosaic virus D satellite RNA-induced programmed cell death in tomato.," *Plant Cell*, vol. 12, no. 7, pp. 1079–92, Jul. 2000.
- [20] M. J. Roossinck and L. E. E. Zhang, "Rearrangements in the 5' J Nontranslated Region and Phylogenetic Analyses of Cucumber Mosaic Virus RNA 3 Indicate Radial Evolution of Three Subgroups," vol. 73, no. 8, pp. 6752–6758, 1999.
- [21] S. Khan, A. T. Jan, B. Aquil, and M. Qazi, "Coat protein gene based characterization of Cucumber mosaic virus isolates infecting banana in India," *J. Phytol.*, vol. 3, no. 2, pp. 94–101, 2011.
- [22] S. Nouri, R. Arevalo, B. W. Falk, and R. L. Groves, "Genetic structure and molecular variability of Cucumber mosaic virus isolates in the United States," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e96582, Jan. 2014.
- [23] M. J. Roossinck, "Evolutionary History of Cucumber Mosaic Virus Deduced by Phylogenetic Analyses Evolutionary History of Cucumber Mosaic Virus Deduced by Phylogenetic Analyses," *J. Virol.*, vol. 76, no. 7, pp. 3382–3387, 2002.

- [24] H.-X. Lin, "Genetic diversity and biological variation among California isolates of Cucumber mosaic virus," *J. Gen. Virol.*, vol. 84, no. 1, pp. 249–258, Jan. 2003.
- [25] V. Koundal, Q. M. R. Haq, and S. Praveen, "Characterization, genetic diversity, and evolutionary link of Cucumber mosaic virus strain New Delhi from India.," *Biochem. Genet.*, vol. 49, no. 1–2, pp. 25–38, Feb. 2011.
- [26] F. García-Arenal, F. Escribe, M. A. Aranda, J. L. Alonso-Prados, J. M. Malpica, and A. Fraile, "Molecular epidemiology of Cucumber mosaic virus and its satellite RNA," *Virus Res.*, vol. 71, no. 1–2, pp. 1–8, Nov. 2000.
- [27] A. Halgren, I. E. Tzanetakis, and R. R. Martin, "Identification, Characterization, and Detection of Black raspberry necrosis virus," *Phytopathology*, vol. 97, no. 1, pp. 44–50, Jan. 2007.
- [28] D. Pratap, S. Kumar, S. K. Snehi, and S. K. Raj, "Biological and molecular characterization of cucumber mosaic virus isolate causing shoestring disease of tomato in India which has closer affinity to European or east Asian isolates of CMV," *Indian J. Virol.*, vol. 23, no. 1, pp. 57–63, 2012.
- [29] R. Acosta-Leal, S. Duffy, Z. Xiong, R. W. Hammond, and S. F. Elena, "Advances in plant virus evolution: translating evolutionary insights into better disease management.," *Phytopathology*, vol. 101, no. 10, pp. 1136–48, Oct. 2011.
- [30] D. Gallitelli, "The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture," *Virus Res.*, vol. 71, no. 1–2, pp. 9–21, Nov. 2000.
- [31] M. Eiras, A. J. Boari, A. Colariccio, A. L. R. Chaves, M. R. Briones, A. R. Figueira, and R. Harakava, "Characterization of Isolates of the cucumovirus cucumber mosaic virus present in Brazil," *J. Plant Pathol.*, vol. 86, pp. 61–69, 2004.