

New records of *Cucumber mosaic virus* isolates and associated-satellite RNA in Colima, Mexico

Nuevos registros de aislamientos del *Cucumber mosaic virus* y su RNA satélite en Colima, México

Pedro Valadez-Ramírez, Javier Paz-Román, Salvador Guzmán-González, Marco Tulio Buenrostro-Nava, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Autopista Colima-Manzanillo Km 40, Tecomán, Colima, México, CP 28930; **Daniel Leobardo Ochoa-Martínez***, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230. *Autor para correspondencia: ldaniel@colpos.mx

Recibido: 15 de Enero, 2019.

Aceptado: 14 de Marzo, 2019.

Valadez-Ramírez P, Paz-Román J, Guzmán-González S, Buenrostro-Nava MT and Ochoa-Martínez DL. 2019. New records of *Cucumber mosaic virus* isolates and associated-satellite RNA in Colima, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(2).

DOI: 1018781/R.MEX.FIT.1901-2

Primera publicación DOI: 28 de Marzo, 2019.

First DOI publication: March 28, 2019.

Resumen. El *Cucumber mosaic virus* (CMV) ocasiona una de las enfermedades virales más importantes a nivel mundial en plantas silvestres y cultivadas. En México son pocos los estudios que se han abordado con este virus, y dada su amplia gama de hospedantes e impacto económico, es necesario contar con mayor información de su presencia y distribución en zonas de importancia agrícola como las del estado de Colima. En este trabajo, se reportan nuevos aislamientos del CMV identificados por RT-PCR, secuenciación de DNA y su

Abstract. *Cucumber mosaic virus* (CMV) causes one of the most important viral diseases in wild and cultivated plants worldwide. Research on CMV in Mexico has been scarce, and due to the economic impact on plant health and wide host range, it is necessary to carry out studies on its presence and distribution in the agricultural geographical areas of the state of Colima. In this study, four CMV isolates identified by RT-PCR, DNA sequencing and phylogenetic analysis are reported: CMV-Vin from periwinkle (*Catharanthus roseus*), CMV-Chi from jalapeño pepper (*Capsicum annuum*), and CMV-Tom from saladette tomato (*Solanum lycopersicum*). In addition, the presence of CMV from cantaloupe melon (*Cucumis melo*) (CMV-Mel) was confirmed. The nucleotide sequences from CMV-Vin, CMV-Chi, and CMV-Mel clustered with CMV isolates from subgroup IB, while CMV-Tom clustered with members of subgroup IA. A satellite RNA sequence, without necrogenic domain, was detected only in CMV-Vin (satRNA Vin). This study reports for the first time the presence of CMV

análisis filogenético: CMV-Vin en vinca (*Catharanthus roseus*), CMV-Chi en chile jalapeño (*Capsicum annuum*) y CMV-Tom en tomate saladette (*Solanum lycopersicum*). Se confirmó, además, la presencia del CMV en melón cantaloupe (*Cucumis melo*) (CMV-Mel). Los aislamientos CMV-Vin, CMV-Chi y CMV-Mel agruparon en el subgrupo IB, mientras que CMV-Tom agrupó en el subgrupo IA de CMV. De estos aislamientos, sólo CMV-Vin evidenció la presencia de un RNA satélite (satRNA Vin) sin dominio necrogénico. Este es el primer reporte de la presencia del CMV en vinca, chile y tomate y de un RNA satélite en vinca en Colima, México.

Palabras clave: Caracterización de aislamientos de CMV, CARNA-5, RT-PCR, secuenciación, análisis filogenéticos.

El *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*, *Bromoviridae*) es uno de los virus con mayor gama de hospedantes, incluyendo cucurbitáceas, solanáceas, cereales, leguminosas y ornamentales. Entre los síntomas que puede causar están: mosaico, clorosis, necrosis, malformaciones foliares y enanismo, entre otros. También es posible que las plantas infectadas sean asintomáticas (Palukaitis *et al.*, 1992). El CMV ha sido modelo de estudio de los diferentes mecanismos de interacción planta-patógeno, y es uno de los diez virus fitopatógenos de mayor importancia económica en el mundo (Rybicki, 2015).

La virosis por CMV es una limitante en la producción de cultivos en más de 18 estados de la República Mexicana y en algunos casos se reportan pérdidas superiores al 80% (Robles *et al.*, 2010).

En el estado de Colima, el CMV se detectó en los cultivares de melón cantaloupe, 'Durango' y 'Primo' en el municipio de Tecomán (Orozco *et al.*, 1994). Desde entonces se desconoce la existencia de

in periwinkle, pepper and tomato plants, and of an RNA satellite from periwinkle in Colima, Mexico.

Key words: CMV isolates, CARNA-5, RT-PCR, DNA sequencing, phylogenetic analyses.

The *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*, *Bromoviridae*) is one of the viruses with a wider host range that includes cucurbitaceae, solanaceae, cereals, legumes and ornamental plants. Some of the symptoms caused by CMV are mosaic, chlorosis, necrosis, foliar deformation and stunting, among others. Infected plants may also be asymptomatic (Palukaitis *et al.*, 1992). CMV has been a study model of the different plant-pathogen interaction mechanisms, and one of the 10 most economically important phytopathogenic viruses worldwide (Rybicki, 2015).

Infections caused by CMV limit crop production in more than 18 states of Mexico, and in some cases losses of more than 80% have been reported (Robles *et al.*, 2010).

CMV was detected in Durango and Primo cantaloupe melon cultivars grown in the municipality of Tecomán, state of Colima, Mexico (Orozco *et al.*, 1994). Since then, no other hosts or subgroups of the virus are known nor its association with satellite RNAs (satRNA) in that location, so the objective of this study was to identify CMV isolates and their satRNA in plants in the state of Colima.

For that purpose, foliar tissue of cultivated plants and weeds with symptoms associated with CMV (*i.e.* mosaic, mottling, leaf filiformity and deformation, as well as stunting, or a combination of them) was collected in the municipalities of Armería, Tecomán and Cuauhtémoc (Figures 1A and 1B). In the laboratory, the samples were washed with deionized water to remove impurities and then stored at -80 °C until their analysis.

otros hospedantes o subgrupos del virus, así como su asociación con RNAs satélite (satRNA) en esta entidad federativa, por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar aislamientos del CMV y su satRNA en plantas del estado de Colima, México.

Se recolectó tejido foliar de plantas cultivadas y malas hierbas con síntomas asociados al CMV (*i.e.* mosaico, moteado, filiformidad y deformación foliar, así como enanismo, o su mezcla) en los municipios de Armería, Tecomán y Cuahtémoc (Figuras A y B). En el laboratorio, las muestras se lavaron con agua desionizada para eliminar las impurezas que pudieran estar presentes, y posteriormente se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

La extracción de RNA total se realizó a partir de 100 mg de tejido utilizando el Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El precipitado con el ácido ribonucleico se disolvió en 32 μL de agua tratada con 0.01% (v/v) de dietilpirocarbonato. La concentración de ácidos nucleicos se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EE.UU.) y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, se realizaron reacciones de transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de punto final en un solo paso para detectar: a) un fragmento del gen endógeno 18S de aproximadamente 300 pb como indicativo de una adecuada calidad de los extractos con los oligonucleótidos descritos por Zamboni *et al.* (2008), b) un segmento del gen de la proteína de la cápside (CP) del CMV de ~ 500 pb con los oligonucleótidos reportados por Wylie *et al.* (1993), y c) satRNA con los oligonucleótidos reportados por Chen *et al.* (2011) que amplifican un fragmento de ~ 390 pb. Todas las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 5 μL y consistieron de una mezcla del amortiguador de reacción 1X (0.2 mM de dNTPs y 1.2 mM de MgSO_4), 0.5 μM de los oligonucleótidos correspondientes (sentido y

Total RNA extraction was performed using 100 mg of tissue with the Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen, USA), following the manufacturer's recommendations. The precipitate with ribonucleic acid was dissolved in 32 μL of treated water with 0.01% (v/v) diethylpyrocarbonate. The concentration of nucleic acids was quantified using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Later on, reverse transcription reactions coupled to endpoint polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed in one step to detect: a) a fragment of approximately 300 bp of the 18S endogenous gene which indicates that the extracts were of adequate quality with the oligonucleotides described by Zamboni *et al.* (2008); b) one ~ 500 bp segment of the CMV capsid protein gene (CP) with the oligonucleotides reported by Wylie *et al.* (1993); and c) satRNA with the oligonucleotides reported by Chen *et al.* (2011) that amplify a ~ 390 bp fragment. All the RT-PCR reactions were performed in 5 μL volumes and consisted of a mixture of 1X reaction buffer (0.2 mM of dNTPs and 1.2 mM of MgSO_4), 0.5 μM of the corresponding oligonucleotides (sense and anti-sense), 0.6% (v/v) polyvinylpyrrolidone 40 (PVP₄₀), 0.2 μL of the enzyme stock solution included in the SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq® High Fidelity kit (Invitrogen, USA) and an average concentration of 32 ng of each RNA extract.

The RT-PCRs were performed using a VeritiFast thermocycler (Applied Biosystems, USA) as follows: one 32-min cycle at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, one 2-min cycle at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by 40 15-s cycles at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15-s cycles at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (for 18 S), $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (for CMV CP) and $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ (for satRNA) and 15-s cycles at $68\text{ }^{\circ}\text{C}$; and one final 5-min cycle at $68\text{ }^{\circ}\text{C}$.

An extract of double-stranded RNA from *Nicotiana glauca* foliar tissue positive to CMV and

antisentido), 0.6% (v/v) de polivinilpirrolidona 40 (PVP₄₀), 0.2 µL de la solución madre de las enzimas contenidas en el kit de la SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq*® High Fidelity (Invitrogen, EE.UU.) y una concentración promedio de 32 ng de cada extracto de RNA.

Cada RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador VeritiFast (Applied Biosystems, EE.UU.) con el siguiente programa: un ciclo de 32 min a 50 °C, un ciclo de 2 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 94 °C, 15 s a 55 °C (para 18 S), 60 °C (para CP del CMV) y 53 °C (para satRNA) y 15 s a 68 °C; y un ciclo final de 5 min a 68 °C.

Como control positivo para los diferentes ensayos, se empleó un extracto de RNA bicatenario obtenido de tejido foliar de *Nicotiana glauca* positivo a CMV y satRNA por RT-PCR y secuenciación. Por su parte, agua grado PCR y un extracto de RNA de tejido foliar de *Catharanthus roseus*, negativo a CMV y satRNA por RT-PCR, sirvieron como controles negativos.

Los productos de las RT-PCR se analizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa 1.5% (p/v) en amortiguador TAE 1X (tris-acetato 40 mM, Na₂EDTA•2H₂O 2 mM) a 80 V. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y se expuso en luz UV, y la imagen resultante se obtuvo con un fotodocumentador (MF-ChemiBIS-DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalén, Israel).

Los amplicones correspondientes a la CP del CMV y satRNA de los distintos aislamientos obtenidos se purificaron con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, y su secuenciación se realizó por el método de Sanger en el Instituto de Neurobiología-Laboratorio de Proteogenómica de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro (<http://www.inb.unam.mx/unidades/molecularyanalitica/bios.html>).

satRNA by RT-PCR and sequencing was used as a positive control in the different trials; as negative controls, PCR grade water and one RNA extract of *Catharanthus roseus* foliar tissue negative to CMV and satRNA by RT-PCR were used.

The RT-PCR amplifications were analyzed by horizontal electrophoresis in 1.5 % (w/v) agarose gels in a TAE 1X buffer (tris-acetate 40 mM, Na₂EDTA•2H₂O 2 mM) at 80 V. The gel was stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and exposed to UV light; the resulting image was visualized in a photo-documentation system (MF-ChemiBIS-DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel).

The corresponding amplicons to CMV CP and satRNA of the different isolates obtained were purified with the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, USA), following the manufacturer's instructions; the sequencing was performed in the Institute of Neurobiology's Laboratory of Proteomics, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla campus at Querétaro (<http://www.inb.unam.mx/unidades/molecularyanalitica/bios.html>), using the Sanger's method.

The sequences obtained in this study and other corresponding to the CP of different CMV subgroups (IA: U32859, U2281, D10538, Y18137, U43888, D00385, AJ276481 and AJ131623, IB: D42079, D28780, U20219 and X89652, and II: Y18138, U22822, Z12818, AB006813, AJ131620, AJ131621, L15336 and D00463) and satRNA (with necrogenic domain: D84389, D10039, U31660, D28559, DQ839133, X86421, X86425, D00542 and D10038; and without necrogenic domain: J02061, D10037, D42081, D42082, X86409, X86424, X54065 and X69136) reported worldwide, as well as the CP sequences of the *Brome mosaic virus* (BMV) (X58458) and the satRNA of the *Peanut stunt virus* (PSV) (NC_003855.1), which were used as external groups, were obtained from

Las secuencias obtenidas en este estudio y otras correspondientes a la CP de diferentes subgrupos del CMV (IA: U32859, U2281, D10538, Y18137, U43888, D00385, AJ276481 y AJ131623, IB: D42079, D28780, U20219 y X89652 y II: Y18138, U22822, Z12818, AB006813, AJ131620, AJ131621, L15336 y D00463) y satRNA (con dominio necrogénico: D84389, D10039, U31660, D28559, DQ839133, X86421, X86425, D00542 y D10038 y sin dominio necrogénico: J02061, D10037, D42081, D42082, X86409, X86424, X54065 y X69136) reportados a nivel mundial, además de las secuencias de la CP del *Brome mosaic virus* (BMV) (X58458) y RNA satélite del *Peanut stunt virus* (PSV) (NC_003855.1), las cuales se usaron como grupos externos, se descargaron del GenBank-NCBI en formato fasta txt y se alinearon con Clustal W. La construcción de los árboles filogenéticos se realizó con MEGA6.0 (Tamura *et al.*, 2013) usando el criterio óptimo de máxima verosimilitud con el modelo de sustitución T92, el cual se ajustó mejor a las secuencias, con 1,000 repeticiones de bootstrap.

En total se recolectaron 30 muestras, 11 de malas hierbas: 2 de empanadilla (*Commelina* sp.), 2 de *Cucurbita* sp., 2 de amargosilla (*Parthenium* sp.), 2 de trébol (*Trifolium* sp.), 1 de malva silvestre (*Malva* sp.) y 2 de monacillo blanco (*Herissantia* sp.); 5 de plantas ornamentales: 3 de vinca (*Catharanthus roseus*) y 2 de azucena (*Hippeastrum* sp.); y 14 de plantas cultivadas: 3 de papaya (*Carica papaya* 'CW-3'), 3 de tomate (*Solanum lycopersicum* Saladet 'Río Grande'), 3 de melón (*Cucumis melo* cantaloupe), 2 de chile (*Capsicum annuum* 'Jalapeño') y 2 de pepino (*Cucumis sativus*). De las 30 muestras, en 4 se amplificó la banda esperada de aproximadamente 500 pb, correspondiente a un segmento de la CP del CMV (Figura C). Dos aislamientos se obtuvieron de Tecomán: uno de melón (CMV-Mel) que mostraba mosaico en la localidad Caleras (19°

the GenBank-NCBI in fasta txt format and aligned with Clustal W. The phylogenetic trees were constructed using MEGA6.0 (Tamura *et al.*, 2013) and the optimal maximum likelihood criterion and the T92 substitution model (which was best suited to the sequences) with 1,000 bootstrap repetitions.

A total of 30 samples were collected: 11 of weeds: 2 of empanadilla (*Commelina* sp.), 2 of *Cucurbita* sp., 2 of amargosilla (*Parthenium* sp.), 2 of clover (*Trifolium* sp.), 1 of common mallow (*Malva* sp.) and 2 of white bladdermallow (*Herissantia* sp.); 5 of ornamental plants: 3 of periwinkle (*Catharanthus roseus*) and 2 of white lily (*Hippeastrum* sp.); and 14 of cultivated plants: 3 of papaya (*Carica papaya* 'CW-3'), 3 of tomato (*Solanum lycopersicum* Saladet 'Río Grande'), 3 of melon (*Cucumis melo* cantaloupe), 2 of chili pepper (*Capsicum annuum* 'Jalapeño') and 2 of cucumber (*Cucumis sativus*). From the 30 samples, 4 amplified the expected band of approximately 500 bp corresponding to a segment of the CMV coat protein (CMV-CP) (Figure 1C). Two isolates were obtained in Tecomán: one of melon (CMV-Mel) showing mosaic (19° 02' 40" N, 103° 54' 04.9" W), and another of periwinkle (CMV-Vin) (18° 54' 52" N, 103° 52' 45.7" W) from plants showing mosaic and foliar deformation (Figures 1A and 1B), all collected in Caleras. The third isolate, detected on chili pepper (CMV-Chi), was collected in the municipality of Armería (18°55'36" N, 103°58'32.5" W) from foliar tissue showing yellowing, mosaic and foliar deformation. The fourth isolate was detected on tomato (CMV-Tom) in plants showing mosaic and foliar distortion collected in the municipality of Cuauhtémoc (19° 19' 42" N, 103° 36' 08.1" W).

The products size of the CP sequencing of the four CMV isolates obtained in this study ranged from 455 to 479 bp, with 94% and 97% nucleotidic

02° 40" N, 103° 54' 04.9" O) y el otro de vinca (CMV-Vin) (18° 54' 52" N, 103° 52' 45.7" O) a partir de plantas con mosaico y deformación foliar (Figuras 1A y 1B). Un tercer aislamiento se identificó de chile (CMV-Chi) en el municipio de Ar-

identity with other isolates of the same virus reported in the GenBank database.

Three out of the four CMV isolates used in the present study showed a lower level of variability among them but were different from the tomato

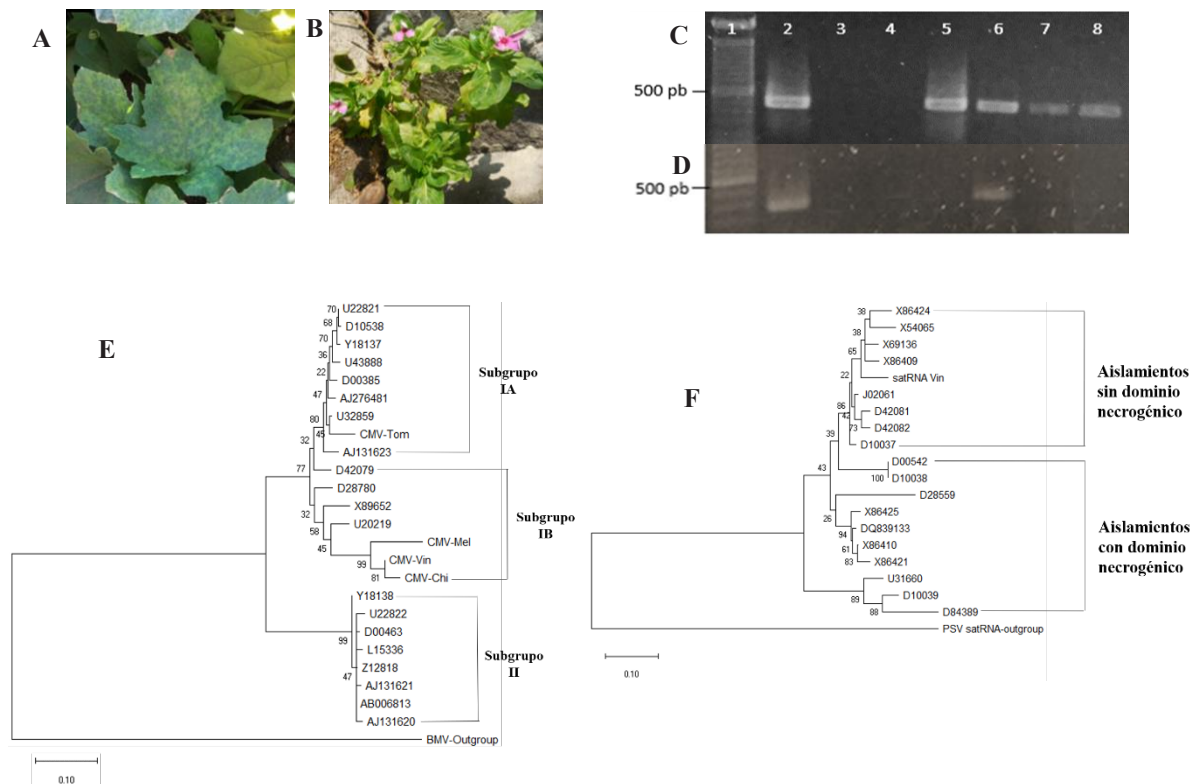


Figura 1. (A) Tejido foliar de melón cantaloupe y (B) vinca infectados con CMV y RNA satélite (en el caso de vinca) mostrando mosaico y deformación foliar. (C) Producto amplificado de la CP del CMV y (D) RNA satélite por RT-PCR punto final en un solo paso. Carril 1: marcador de masa molecular de 100 pb (Promega®); Carril 2: control positivo (extracto de RNA bicatenario de *Nicotiana glauca* infectada con CMV y RNA satélite); Carril 3: control negativo (extracto de RNA de tejido foliar de *Catharanthus roseus* negativo a CMV y RNA satélite); Carril 4: control negativo (agua grado PCR); Carril 5: muestra de tomate (CMV-Tom); Carril 6: muestra de vinca (CMV-Vin); Carril 7: muestra de chile (CMV-Chi); Carril 8: muestra de melón (CMV-Mel). Análisis filogenético de (E) aislamientos de CMV y (F) RNA satélite obtenidos en Colima en comparación con secuencias nucleotídicas obtenidas de GenBank-NCBI.

Figure 1. (A) Cantaloupe melon and (B) periwinkle foliar tissue infected with CMV and satellite RNA; periwinkle foliar tissue showing mosaic and foliar deformation. (C) Amplified product of the CMV CP, and (D) satellite RNA by endpoint one step RT-PCR. Lane 1: molecular weight marker of 100 bp (Promega®); Lane 2: positive control (extract of double-stranded RNA from *Nicotiana glauca* infected with CMV and satellite RNA); Lane 3: negative control (extract of RNA of *Catharanthus roseus* foliar tissue negative to CMV and satellite RNA); Lane 4: negative control (PCR grade water); Lane 5: tomato sample (CMV-Tom); Lane 6: periwinkle sample (CMV-Vin); Lane 7: chili pepper sample (CMV-Chi); Lane 8: melon sample (CMV-Mel). Phylogenetic analysis of (E) CMV isolates, and (F) satellite RNA collected in Colima compared with nucleotidic sequences obtained from the GenBank-NCBI.

mería (18° 55' 36" N, 103° 58' 32.5" O) en tejido foliar con amarillamiento, mosaico y deformación. El cuarto aislamiento se detectó en tomate (CMV-Tom) procedente de Cuauhtémoc (19° 19' 42" N, 103° 36' 08.1" O), en plantas que mostraban mosaico y distorsión foliar.

El tamaño de los productos de la secuenciación de la CP de los cuatro aislamientos del CMV obtenidos en este estudio osciló de 455 a 479 pb, con porcentajes de identidad nucleotídica entre 94% y 97% con otros aislamientos reportados en la base de datos del GenBank de este mismo virus.

Tres de los cuatro aislamientos de CMV del presente estudio mostraron poca variabilidad entre sí, pero fueron diferentes del aislamiento de tomate (CMV-Tom); es posible que se observe mayor variabilidad entre aislamientos si se incrementa el número de especies vegetales analizadas. De acuerdo al análisis filogenético, el CMV-Tom agrupó con aislamientos del subgrupo IA y más cercanamente con un aislamiento de banano procedente de Colombia (U32859). CMV-Vin, CMV-Chi y CMV-Mel agruparon con el subgrupo IB (Figura E). Los aislamientos del subgrupo I se encuentran principalmente en zonas tropicales y subtropicales mientras que los del subgrupo II son prevalentes en zonas templadas (Palukaitis *et al.*, 1992).

Sólo en el aislamiento CMV-Vin se detectó un RNA satélite (Figura D), con un tamaño estimado en 381 pb por secuenciación y con 91% de identidad nucleotídica con otros aislamientos del mundo. Este satélite agrupó con otros aislamientos sin dominio necrogénico (X86424, X54065, X69136 y X86409) (Figura F). Este resultado muestra la necesidad de estudiar el comportamiento biológico del satRNA, particularmente la sintomatología que se observa en su presencia, así como su posible efecto en la transmisión del CMV por áfidos, entre otros aspectos.

isolates (CMV-Tom). A higher level of variability could be observed among isolates if the number of plant species analyzed increases. According to the phylogenetic analysis, the CMV-Tom was grouped with isolates of the IA subgroup, and more closely with a banana isolate from Colombia (U32859). CMV-Vin, CMV-Chi and CMV-Mel were grouped with the IB subgroup (Figure 1E). The subgroup I isolates are mainly found in tropical and subtropical zones, while the isolates from the subgroup II prevail in temperate zones (Palukaitis *et al.*, 1992).

The CMV-Vin isolate was the only one containing a satRNA (Figure 1D) with an estimated size of 381 bp by sequencing and 91 % nucleotidic identity with other isolates of the world. The satellite was grouped with other isolates without necrogenic domain (X86424, X54065, X69136 and X86409) (Figure 1F). This result shows the need to study the satRNA's biological behavior, particularly the symptoms observed when it is present, as well as its possible effect on CMV transmission by aphids, among other aspects.

Despite the low number of CMV isolates obtained and characterized in this study, our results confirmed the presence of CMV in the state of Colima and suggested that there is diversity among them. The present study suggest the need to continue analyzing a greater number of samples in order to deepen this observation.

In conclusion, three new CMV isolates are reported in the state of Colima, in chili pepper, tomato and periwinkle, the latter with a satellite RNA without necrogenic domain, as well as the presence of CMV in cantaloupe melon in the municipality of Tecmán.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

A pesar del bajo número de aislamientos del CMV obtenidos y caracterizados en este estudio, los resultados confirman la presencia de CMV en el estado de Colima y sugieren diversidad entre los mismos. El presente estudio sienta las bases para continuar con el análisis de un mayor número de muestras con la finalidad de profundizar sobre esta observación.

En conclusión, se reportan en el estado de Colima, tres nuevos aislamientos de CMV en chile, tomate y vinca, éste último con un RNA satélite sin dominio necrogénico. A su vez, se confirma la presencia del CMV en melón cantaloupe en el municipio de Tecomán.

## LITERATURA CITADA

- Chen S, Gu H, Wang X, Chen J and Zhu W. 2011. Multiplex RT-PCR detection of *Cucumber mosaic virus* subgroups and *Tobamoviruses* infecting tomato using 18S rRNA as an internal control. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43:465-471. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr031>
- Orozco SM, López AO, Pérez ZO and Delgadillo SF. 1994. Effect of transparent mulch, floating row covers and oil sprays on insect populations, virus diseases and yield of Cantaloup. *Biological Agriculture and Horticulture* 10:229-234. <https://doi.org/10.1080/01448765.1994.9754675>
- Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG and Francki RIB. 1992. *Cucumber mosaic virus*. *Advances in Virus Research* 41:281-348. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60039-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60039-1)
- Robles HL, González FAC, Gill LEM, Pérez ML y López DJC. 2010. Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. *Tecnociencia Chihuahua* 6:72-86. [http://tecnociencia.uach.mx/numeros/.../numeros/v4n2/data/Virus\\_fitopatogenos\\_que\\_afectan\\_al\\_cultivo\\_del\\_chile\\_en\\_Mexico\\_y\\_analisis\\_de\\_las\\_tecnicas\\_de\\_deteccion.pdf](http://tecnociencia.uach.mx/numeros/.../numeros/v4n2/data/Virus_fitopatogenos_que_afectan_al_cultivo_del_chile_en_Mexico_y_analisis_de_las_tecnicas_de_deteccion.pdf)
- Rybicki EP. 2015. A top ten list for economically important plant viruses. *Archives of Virology* 160:17-20. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2295-9>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2715-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Wylie S, Wilson CR, Jones RAC and Jones MGK. 1993. A polymerase chain reaction assay for *Cucumber mosaic virus* in lupin seeds. *Australian Journal of Agricultural Research* 44:41-51. <https://doi.org/10.1071/AR9930041>
- Zamboni A, Pierantoni L and De Franceschi P. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. *iForest* 1:122-125. <https://doi.org/10.3832/ifor0465-0010122>