

BEGOMOVIRUS ASOCIADOS AL CULTIVO DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*)

BEGOMOVIRUSES ASSOCIATED WITH ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa*)

Erika J. Zamora-Macorra¹, Daniel L. Ochoa-Martínez^{2*}, Patricia Velázquez-Fernández², Javier Hernández-Morales²

¹Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. ²Fitopatología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo. Estado de México. (ldaniel@colpos.mx)

RESUMEN

El género *Begomovirus* se compone de virus fitopatógenos con un genoma de DNA circular, de cadena sencilla, que se transmiten por mosquita blanca. En 2014 en el estado de Guerrero, México, se reportó la enfermedad del amarillamiento de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), asociada al begomovirus *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV). A partir de entonces el número de parcelas afectadas ha incrementado en la entidad y se ha observado un número mayor de plantas con mosaico, albinismo, aclaramiento de nervaduras, clorosis intervenal y amarillamiento. Con base en lo anterior, los objetivos de este estudio fueron determinar si existen otras especies de begomovirus en el cultivo de jamaica, bajo la hipótesis de que síntomas diferentes pueden significar al menos otra especie distinta de begomovirus. Plantas de jamaica con amarillamiento, mosaico y aclaramiento de nervaduras se recolectaron en dos parcelas del municipio de Ayutla y una del municipio de Tecoaapa, Guerrero. Las plantas colectadas fueron 12 con síntomas y tres asintomáticas. El DNA de las plantas se amplificó por círculo rodante (ACR) y luego por PCR para la detección de begomovirus y de alfa y beta-satélites. En plantas de jamaica con aclaramiento de nervaduras se detectó a OYMMV, *Sida golden mosaic Honduras virus* (SGMHV) en plantas con manchas cloróticas y aclaramiento de nervaduras y *Whitefly-associated begomovirus 3* en plantas con mosaico, clorosis intervenal y amarillamiento. Alfa y beta-satélites no se detectaron. Este es el primer reporte del SGMHV asociado a jamaica y de la presencia de *Whitefly-associated begomovirus 3* en una especie vegetal. Por lo tanto, para este último proponemos el nombre de *Jamaica yellow mosaic virus*.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*, *Whitefly-associated begomovirus 3*, VEM-begomovirus 3, OYMMV, SiGMHV, amplificación por círculo rodante.

ABSTRACT

The genus *Begomovirus* is comprised of phytopathogenic viruses with a genome of circular DNA, simple chain, transmitted by whiteflies. In 2014 in the state of Guerrero, Mexico, the yellowing disease of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) was reported, associated with the begomovirus *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV). Since then the number of affected plots has increased in the state and a higher number of plants has been observed with mosaic, albinism, discoloring of leaf veins, interveinal chlorosis and yellowing. Therefore, the objectives of this study were to determine whether there are other species of begomovirus in the Roselle crop, under the hypothesis that different symptoms might lead at least to another distinctive *Begomovirus* species. Roselle plants with yellowing, mosaic and leaf veins discoloration were collected from two plots in Ayutla, and from another one in Tecoaapa, both municipalities in Guerrero state. Collected plants were, 12 with symptoms and three without symptoms. Plants DNA was amplified by rolling circle (RCA) and afterwards by RCP for the detection of begomovirus and of alpha and beta satellites. In Roselle plants with leaf vein clearing, OYMMV was detected, *Sida golden mosaic Honduras virus* (SGMHV) in plants with chlorotic spots and leaf vein discoloration and *Whitefly-associated begomovirus 3* in plants with mosaic, interveinal chlorosis and yellowing. Alpha and beta-satellites were not detected. This is the first report of the SGMHV associated to Roselle and, particularly of the presence of the *Whitefly-associated begomovirus 3* in a plant species. Therefore, for this latest, we propose the name of *Jamaica yellow mosaic virus*.

Key words: *Hibiscus sabdariffa*, *Whitefly-associated begomovirus 3*, VEM-begomovirus 3, OYMMV, SiGMHV, rolling circle amplification.

* Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2018. Aprobado: julio, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: 1275-1284. 2019.

INTRODUCCIÓN

El género *Begomovirus* (familia Geminiviridae) incluye virus fitopatógenos con DNA circular, de una sola cadena, encapsidado en partículas geminadas icosaédricas; su genoma puede ser monopartita (DNA-A) o bipartita (DNA-A y DNA-B), cada uno con aproximadamente 2.6 kb (Rojas *et al.*, 2005). Los begomovirus representan uno de los problemas fitosanitarios principales para la producción agrícola mundial, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales (Khan, 2000; Mansoor *et al.*, 2003). A estos virus los transmite la mosquita blanca, principalmente *Bemisia tabaci* (Hemiptera), insecto polífago que puede alimentarse de cultivos de las familias Cucurbitaceae, Solanaceae, Fabaceae y Malvaceae (Varma y Malathi, 2003). La infección ocasionada por begomovirus afecta la fotosíntesis y provoca decremento de almidón (Brown *et al.*, 1993). Los síntomas típicos que causan los begomovirus son enchinamiento foliar, mosaico, amarillamiento de nervaduras y hojas, frecuentemente acompañado por achaparramiento (Leke *et al.*, 2015).

Las interacciones planta-begomovirus-vector repercuten en las dinámicas poblacionales de este último y la epidemiología de la enfermedad (Luan *et al.*, 2014). Diferentes begomovirus han generado epidemias en zonas hortícolas del sur de Estados Unidos, Florida y el Caribe, México, Centroamérica, Venezuela y Brasil (Polston y Anderson, 1997). En el caso del *African cassava mosaic virus* y el *Tomato yellow leaf curl virus*, se han registrado pérdidas millonarias en yuca (África e India) y tomate (África, Europa, Caribe, América Central, Japón, México y Estados Unidos), respectivamente (Scholthof *et al.*, 2011; Leke *et al.*, 2015).

En México, la planta de jamaica (*H. sabdariffa* L.) se cultiva para obtener cálices deshidratados y tallos que se utilizan como productos alimenticios, farmacéuticos, cosméticos y textiles (Salinas *et al.*, 2012). El estado de Guerrero es el productor principal de jamaica, con 14 096.75 ha cosechadas y valor producción de 152 728.45 (miles de pesos) (SIAP, 2018). En 2013 en esta entidad se observó una expresión de la enfermedad cuyos síntomas eran amarillamiento, mosaico, aclaramiento de nervaduras y variegado de los cálices. Actualmente en las zonas productoras hay parcelas con una incidencia mayor al 80% de plantas

INTRODUCTION

The genus *Begomovirus* (family Geminiviridae) includes pathogenic viruses with circular DNA, of single chain, encapsulated in icosahedral geminate particles; its genome can be monopartite (DNA-A) or bipartite (DNA-A and DNA-B), each one with approximately 2.6 kb (Rojas *et al.*, 2005). The begomoviruses represent one of the principal phytosanitary problems for world agricultural production, especially in tropical and subtropical regions (Khan, 2000; Mansoor *et al.*, 2003). These viruses are transmitted by the whitefly, mainly *Bemisia tabaci* (Hemiptera), a polyphagous insect which can feed on crops of the families Cucurbitaceae, Solanaceae, Fabaceae and Malvaceae (Varma and Malathi, 2003). The infection caused by begomovirus affects photosynthesis and provokes decrease of starch (Brown *et al.*, 1993). The typical symptoms caused by begomovirus are foliar curling, mosaic, veins and leaves yellowing, frequently accompanied by stunting (Leke *et al.*, 2015).

The plant-begomovirus-vector interactions have repercussions on the population dynamics of the vector and the epidemiology of the disease (Luan *et al.*, 2014). Different begomoviruses have generated epidemics in horticultural zones of southern U.S., Florida and the Caribbean, Mexico, Central America, Venezuela and Brazil (Polston and Anderson, 1997). In the case of the *African cassava mosaic virus* and the *Tomato yellow leaf curl virus*, significant losses have been registered in yucca (Africa and India) and tomato (Africa, Europe, Caribbean, Central America, Japan, Mexico and the United States), respectively (Scholthof *et al.*, 2011; Leke *et al.*, 2015).

In Mexico, Roselle (*H. sabdariffa* L.) is cultivated to obtain dehydrated calyxes and stems, which are used as products in the food, pharmaceutical, cosmetic and textile industries (Salinas *et al.*, 2012). The state of Guerrero is the principal producer of Roselle, with 14 096.75 ha harvested and a production value of 152 728.45 (thousands of MXN pesos) (SIAP, 2018). In 2013 in this state a new expression of disease was observed whose symptoms were yellowing, mosaic, leaf veins discoloration and variegate coloration of the calyxes. At present, in the production zones, plots are observed with an incidence higher than 80% of plants with symptoms. PCR was used to detect

con síntomas. Por medio de PCR se detectó *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) en plantas de jamaica con síntomas de clorosis y amarillamiento (Velázquez *et al.*, 2016). Además, en campos de cultivo se han observado plantas con síntomas diferentes a los arriba mencionados. Por lo que, probablemente otros begomovirus, además el OYMMV, estén presentes.

El objetivo de este estudio fue determinar los begomovirus en el cultivo de jamaica asociados a los síntomas antes descritos, y la hipótesis fue que diferentes síntomas pueden significar al menos otra especie distinta de begomovirus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de plantas

En agosto de 2015 se colectaron plantas con síntomas y asintomáticas de jamaica en dos parcelas del municipio de Ayutla y una parcela del municipio de Tecoaapa, Guerrero. Doce plantas se recolectaron con síntomas y tres asintomáticas. Las muestras se trasladaron y se mantuvieron individualmente en jaulas en un invernadero del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, para mantener la fuente de inóculo.

Extracción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos totales se extrajeron de 100 mg de lámina foliar por planta con el reactivo Plant RNA Purification Reagent® (Invitrogen No.12322-012) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una planta asintomática se utilizó como control negativo. Para eliminar la presencia de inhibidores en las extracciones, cada muestra se lavó tres veces con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1) y se precipitó con NaOH 3M. La concentración final de las extracciones se cuantificó en un nanodrop (Thermo Scientific mod. 2000) y su integridad se corroboró mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Los ácidos nucleicos se almacenaron a -20°C para su análisis posterior.

Amplificación por círculo rodante

Para amplificar el DNA circular en las extracciones de ácidos nucleicos totales de plantas, se utilizó el kit TempliPhi 100 Amplification® (Amersham Biosciences) con las instrucciones del fabricante. Los ácidos nucleicos totales (100 ng) se usaron por reacción y la mezcla se incubó a 37°C por 18 h. La amplificación se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Okra yellow mosaic Mexico virus (OYMM) in Roselle plants with symptoms of chlorosis and yellowing (Velázquez *et al.*, 2016). Furthermore, in crop fields, plants have been observed with other symptoms, different from those mentioned above. Therefore, it is probable that, other begomoviruses in addition to OYMMV, are present.

The objective of the study was to determine the begomoviruses in the Roselle crop associated with the symptoms described above, under the hypothesis that different symptoms may mean at least another distinctive species of begomovirus.

MATERIALS AND METHODS

Collection of plants

In August of 2015, plants with symptoms and asymptomatic Roselle plants were collected in two plots of Ayutla and in one plot of Tecoaapa, both municipalities of Guerrero state. Twelve plants were collected with symptoms along with three asymptomatic plants. Samples were brought and kept individually in cages in a greenhouse of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, to maintain the source of inoculum.

Nucleic acids extraction

Total nucleic acids were extracted from 100 mg of foliar lamina per plant with the reactive Plant RNA Purification Reagent® (Invitrogen No. 12322-012) following the instructions of the manufacturer. An asymptomatic plant was used as negative control. In order to eliminate the presence of inhibitors in the extractions, each sample was washed three times with phenol: chloroform: isoamyl alcohol (24:24:1) and precipitated with NaOH 3M. The final concentration of the extractions was quantified in a nanodrop (Thermo Scientific mod. 2000) and their integrity was confirmed through electrophoresis in an agarose gel at 1%. The nucleic acids were stored at -20°C for later analysis.

Rolling circle amplification

In order to amplify the circular DNA in the extractions of total nucleic acids of plants, the kit TempliPhi 100 Amplification (Amersham Biosciences) was used following the instructions of the manufacturer. Total nucleic acids (100 ng) were used per reaction and the mixture was incubated at 37°C for 18 h. The amplification was corroborated through electrophoresis in 0.8% agarose gel.

PCR para detectar begomovirus, alfa y beta-satélites

Iniciadores específicos se utilizaron para cada caso (Cuadro 1). La mezcla de reacción para la PCR se hizo con 1 µL del DNA amplificado por círculo rodante, 1X amortiguador de PCR, 0.2 mM dNTPs, 2.0 mM MgCl₂, 10 µM de cada primer y 0.5 U de Taq polimerasa (PROMEGA®), ajustando todo a un volumen final de 25 µL. Un termociclador (Techne TC-512®) se utilizó. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, las bandas de interés se separaron del gel, se purificaron con PCR Clean-Up System Wizard[†] y se secuenciaron. Las secuencias se alinearon con el programa BIOEDIT para compararlas con la base de datos del GenBank.

Secuenciación masiva

El DNA de una de las muestras que fue positiva para begomovirus por PCR se amplificó por círculo rodante (CR) para enriquecerla. El producto de CR se envió al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, para obtener la secuencia completa de los segmentos A y B, la realización del análisis bioinformático y el ensamble *de novo*. Los ensamblajes resultantes de ambos segmentos se compararon con la base de datos del GenBank y se utilizaron para la elaboración de los mapas genómicos con el programa SnapGene®.

Inoculación por injerto

Las plantas recolectadas en campo que amplificaron para begomovirus por PCR se usaron como fuente de inóculo para

PCR to detect begomovirus, alpha and beta-satellites

Specific primers were used for each case (Table 1). The reaction mixture for PCR was made with 1 µL of the rolling circle amplified DNA, 1X buffer of PCR, 0.2 mM dNTPs, 2.0 mM MgCl₂, 10 µM of each primer and 0.5 U of Taq polymerase (PROMEGA®), adjusting everything to an end volume of 25 µL. A thermocycler (Techne TC-512®) was used. The PCR products were visualized by electrophoresis in a 1% agarose gel, the bands of interest were separated from the gel, then purified with PCR Clean-Up System Wizard[†] and they were sequenced. Sequences were aligned with the program BIOEDIT to compare them with the data base of GenBank.

Massive sequencing

The DNA of one of the samples that was positive for begomovirus by PCR was amplified by rolling circle (CR) to enrich it. The CR product was sent to the Biotechnology Institute of the National Autonomous University of Mexico, to obtain the complete sequence of segments A and B, the bioinformatics analysis and the *de novo* assembly. The resulting assemblies of both segments were compared with the GenBank database and used for the elaboration of genomic maps with the SnapGene® program.

Inoculation by grafting

Field-harvested plants that amplified for begomovirus by PCR were used as a source of inoculum to confirm the

Cuadro 1. Secuencia de iniciadores y ciclos térmicos utilizados de PCR.

Table 1. Sequence of primers and thermal cycles used of PCR.

Fragmento y tamaño esperado	Iniciadores	Ciclo térmico	
DNA-A 1400 pb	S: AAAACTCGAGGATGTGAAGGCCCATG AS: AAAAGGGAAGACGATGTGGGC (Velázquez <i>et al.</i> , 2016)	94 °C - 4 min 94 °C - 1 min 55 °C - 1 min 72 °C - 1.5 min 72 °C - 5 min	} 30 ciclos
Beta-satélite 1350 pb	β01:GGTACCACTACGCTACGCAGCAGCC β02:GGTACCTACCCTCCAGGGGTACAC (Briddon <i>et al.</i> , 2003).	94 °C - 4 min 94 °C - 1 min 55 °C - 1 min 72 °C - 2 min 72 °C - 5 min	
Alfa-satélite [‡] 1400 pb	AD: AAAGGTGAAGGCAAATCCACATTTGC AI: AACACCACCAGTGGGTCCATAAAC		

[†]Los iniciadores del alfa-satélite (AD y AI) se diseñaron para amplificar todo el genoma. [‡]The primers of the alpha-satellite (AD and AI) were designed to amplify all of the genome.

confirmar la transmisibilidad del virus detectado. De cada planta positiva a begomovirus se injertaron hojas con síntomas sobre plantas sanas de jamaica de 40 d de emergencia, obtenidas de semilla, en invernadero. Tres plantas sanas se injertaron por cada planta positiva y se incluyeron tres plantas sanas injertadas con hojas de plantas asintomáticas como control. Las observaciones se realizaron cada 24 h por 50 d y las plantas injertadas que mostraron síntomas se analizaron mediante PCR para begomovirus como se indicó antes. Los productos amplificados se secuenciaron, las secuencias se alinearon con el programa BIOEDIT y se compararon con la base de datos del GenBank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colecta de plantas

Los síntomas en las plantas fueron: 1) aclaramiento de nervaduras, 2) manchas cloróticas y aclaramiento de nervaduras y 3) mosaico, clorosis interveinal y amarillamiento.

PCR para detectar begomovirus, alfa y beta-satélites

En las amplificaciones por círculo rodante de las 12 plantas con síntomas se obtuvieron segmentos de ADN-A de ~10,250 pb (Figura 1A). En las plantas asintomáticas no hubo amplificación. Begomovirus se detectaron mediante PCR (~1400 pb) (Figura 1B) y alfa o beta-satélites no se detectaron en las 12 plantas con síntomas analizadas. El resultado de las secuencias consenso se depositó en el GenBank e indicó la presencia de tres begomovirus:

- 1) Un amplicón de ~1140 pb, con 92% de similitud con *Sida golden mosaic Honduras virus* en plantas con manchas cloróticas y aclaramiento de nervaduras (Figura 1C). Número de acceso: KY767922.
- 2) Un producto de PCR de 1150 pb, con 93% de similitud con *Okra yellow mosaic Mexico virus* en plantas con aclaramiento de nervaduras (Figura 1D). Número de acceso: KY767921.
- 3) Un amplicón de 1121 pb, con 98% de similitud con *Whitefly-associated begomovirus 3* en plantas con mosaico, clorosis interveinal y amarillamiento (Figura 1E). Números de acceso: KY767919 y KY767920.

transmissibility of the virus detected. From each positive plant to begomovirus, leaves were grafted with symptoms on healthy Roselle plants of 40 d from emergency, obtained from seed, in the greenhouse. Three healthy plants were grafted for each positive plant and three healthy plants grafted with asymptomatic plant leaves were included as a control. Observations were made every 24 h for 50 d and grafted plants that showed symptoms were analyzed by PCR for begomovirus as indicated above. The amplified products were sequenced, the sequences were aligned with the BIOEDIT program and compared to the GenBank database.

RESULTS AND DISCUSSION

Collection of plants

The symptoms in the plants were as follows: 1) nervation discoloring, 2) chlorotic spots and veins discoloration and 3) mosaic, interveinal chlorosis and yellowing.

PCR to detect begomovirus, alpha and beta-satellites

In the rolling circle amplifications of the 12 plants with symptoms, DNA-A segments of ~10,250 pb were obtained (Figure 1A). In the asymptomatic plants there was no amplification. Begomoviruses were detected by means of PCR (~1400 pb) (Figure 1B) and neither alpha nor beta-satellites were detected in the 12 plants with symptoms analyzed. The result of the sequence consensus was deposited in the GenBank and indicated the presence of three begomoviruses:

- 1) An amplicon of ~1140 pb, with 92% similarity with *Sida golden mosaic Honduras virus* in plants with chlorotic spots and veins discoloration (Figure 1C). Access number: KY767922.
- 2) A product of PCR of 1150 pb, with 93% similarity with *Okra yellow mosaic Mexico virus* in plants with veins discoloration (Figure 1D). Access number: KY767921.
- 3) An amplicon of 1121 pb, with 98% similarity with *Whitefly-associated begomovirus 3* in plants with mosaic, interveinal chlorosis and yellowing (Figure 1E). Access numbers: KY767919 and KY767920.

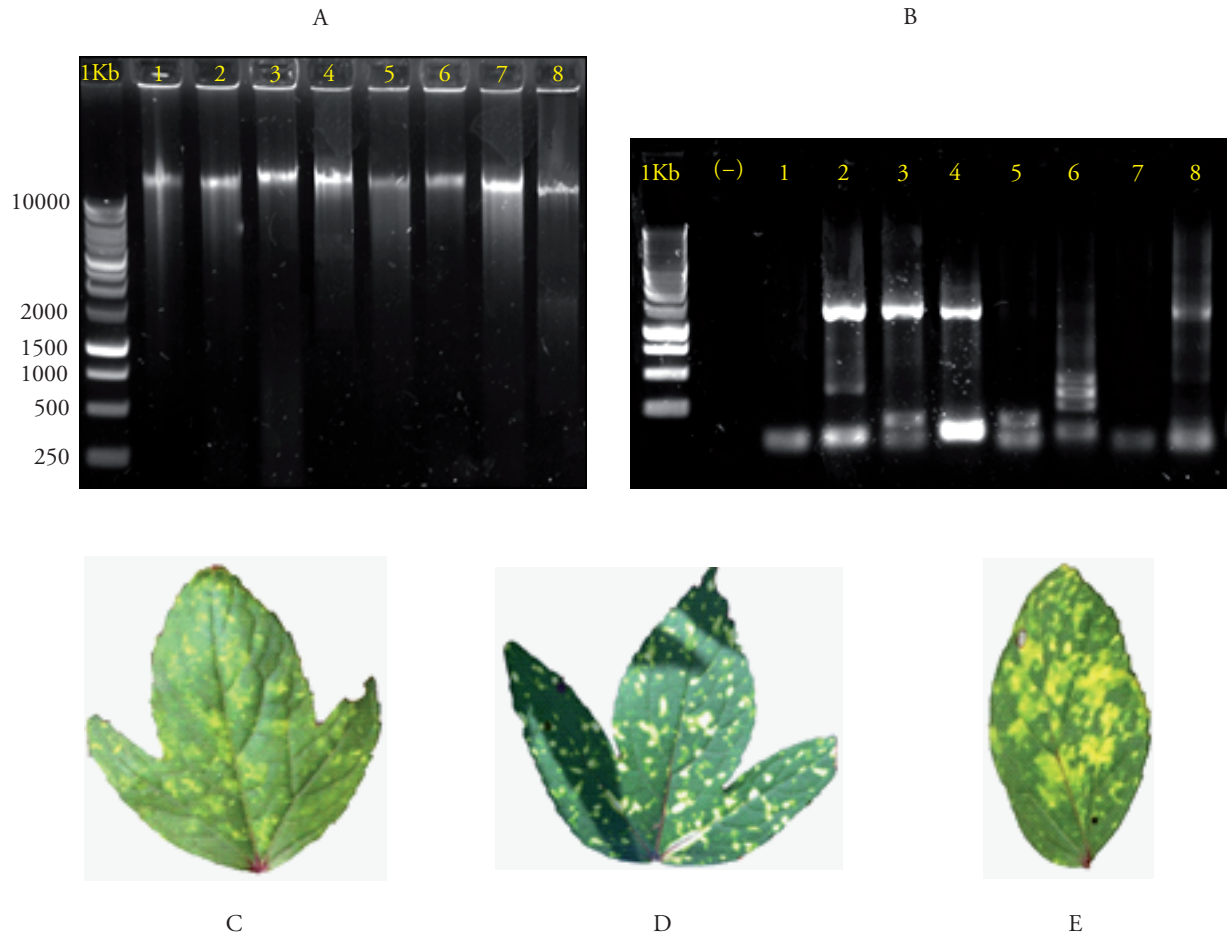


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de A: productos de amplificaciones por círculo rodante. B: productos de PCR del segmento DNA-A de begomovirus (~1500 pb). Hojas de jamaica con síntomas asociados a C: *Sida golden mosaic Honduras virus*, D: *Okra yellow mosaic Mexico virus* y E: *Whitefly-associated begomovirus 3*. 1Kb: Marcador de peso molecular. (-): Control negativo (DNA de planta sana). Carriles 1-8: plantas de jamaica con síntomas colectadas en campo.

Figure 1. Electrophoresis in agarose gel of A: products of rolling circle amplifications. B: products of PCR of the DNA-A segment of begomovirus (~1500 pb). Roselle leaves with symptoms associated to C: *Sida golden mosaic Honduras virus*, D: *Okra yellow mosaic Mexico virus* and E: *Whitefly-associated begomovirus 3*. 1Kb: Molecular weight marker. (-): Negative control (DNA of healthy plant). Bands 1-8: Roselle plants with symptoms collected in the field.

Secuenciación masiva

Debido a la detección *in planta* del *Whitefly-associated begomovirus 3*, se realizó la secuenciación completa de los segmentos A y B de la muestra que amplificó para este virus. El ensamble del DNA-A consistió de 2629 pb (No. acceso MH457190) y el DNA-B de 2532 pb (No. de acceso MH457191) con una similitud de 98 y 91% con los segmentos A y B del *Whitefly-associated begomovirus 3* (VEM begomovirus 3) (Figura 2).

Massive sequencing

Due to the detection *in planta* of the *Whitefly-associated begomovirus 3*, the complete sequencing was made of segments A and B of the sample which amplified for this virus. The ensemble of the DNA-A consisted of 2629 pb (Access No. MH457190) and the DNA-B of 2532 pb (Access Number MH457191) with a similarity of 98 and 91% with segments A and B of the *Whitefly-associated begomovirus 3* (VEM begomovirus 3) (Figure 2).

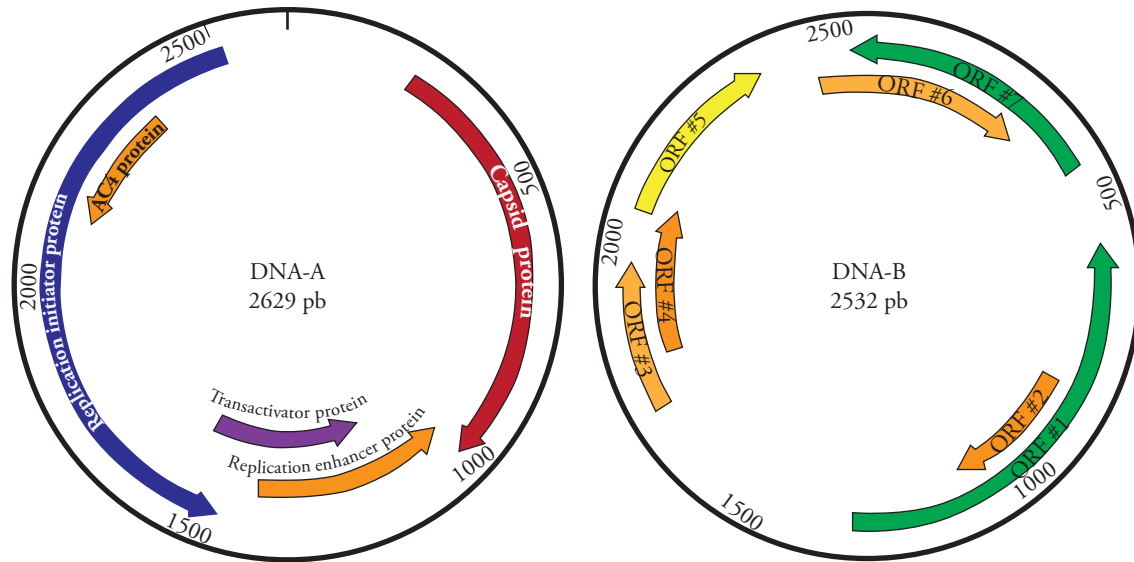


Figura 2. Mapa genómico del DNA-A y DNA-B del *Whitefly-associated begomovirus 3* detectado en plantas de jamaica con síntomas de mosaico, clorosis intervenal y amarillamiento.

Figure 2. Genomic map of the DNA-A and DNA-B of the *Whitefly-associated begomovirus 3* detected in Roselle plants with symptoms of mosaic, interveinal chlorosis and yellowing.

Inoculación por injerto

Todas las plantas sanas injertadas con hojas sintomáticas de plantas positivas a begomovirus, recolectadas en campo, mostraron síntomas de mosaico y clorosis 25 d después del injerto. Las plantas sanas injertadas con hojas de plantas asintomáticas no mostraron síntomas. Sólo se tuvo amplificación por PCR para begomovirus en las plantas injertadas que mostraron síntomas y sus secuencias correspondieron con los tres begomovirus que se detectaron en las plantas recolectadas en campo y que fueron fuente de inóculo (*Sida golden mosaic Honduras virus*, *Okra yellow mosaic Mexico virus* y *Whitefly-associated begomovirus 3*).

En campo se detectaron en la misma parcela plantas de jamaica infectadas con begomovirus distintos; este es un fenómeno común, atribuido a un proceso evolutivo que favorece la recombinación y, por consiguiente, la aparición de nuevas especies o aislamientos más severos (Sanz *et al.*, 2000; García *et al.*, 2007). Los virus detectados en las plantas de jamaica en esta investigación (OYMMV, SiGMHV y *Whitefly-associated begomovirus 3*) son bipartitas y en ningún caso se encontraron satélites. En India se observó que plantas de mesta (*Hibiscus cannabinus*) o jamaica (*H. sabdariffa*) que presentaban aclaramiento

Inoculation by grafting

All of the healthy plants grafted with symptomatic leaves of plants positive to begomovirus, collected in the field, showed symptoms of mosaic and chlorosis 25 days after the graft. The healthy plants grafted with leaves of asymptomatic plants did not show any symptoms. There was only amplification by PCR for begomoviruses in the grafted plants that showed symptoms, and their sequences corresponded to the three begomoviruses that were detected in the plants collected in the field and that were the source of inoculum (*Sida golden mosaic Honduras virus*, *Okra yellow mosaic Mexico virus* and *Whitefly-associated begomovirus 3*).

In the field in the same plot Roselle plants infected with different begomoviruses were detected; this is a common phenomenon, attributed to an evolutive process that favors the recombination, and consequently, the appearance of new species or more severe isolates (Sanz *et al.*, 2000; García *et al.*, 2007). The viruses detected in the Roselle plants in the present investigation (OYMMV, SiGMHV and *Whitefly-associated begomovirus 3*) are bipartite and no satellites were found in any case. In India it was observed that mesta (*Hibiscus cannabinus*) or Roselle (*H. sabdariffa*) that presented veins discoloration were

de nervaduras estaban infectadas con *Ludwigia leaf distortion betasatellite*, *Cotton leaf curl Multan betasatellite* (Das *et al.*, 2008), *Tomato leaf curl Joydebpur betasatellite* (Paul *et al.*, 2008) y *Mesta yellow vein mosaic virus* (Chatterjee *et al.*, 2007).

El OYMMV se detectó por primera vez en okra (*Abelmoschus esculentus*) en el estado de Guerrero, México, en plantas con síntomas de amarillamiento, moteado y distorsión foliar (De La Torre *et al.*, 2006). Después, se reportó en Texas, EE.UU. (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2010), y luego en el estado de Guerrero, México, se encontró en plantas de jamaica (*H. sabdariffa*) (Velázquez *et al.*, 2016). En la presente investigación, este virus estuvo asociado a plantas de jamaica que mostraban aclaramiento de nervaduras. *Sida golden mosaic Honduras virus* (SiGMHV) se reportó por primera vez en Honduras en *Sida rhombifolia*, especie con distribución amplia en Centroamérica (Frischmuth *et al.*, 1997) y no se había detectado en otra especie vegetal.

Whitefly-associated begomovirus 3 se detectó en adultos de *Bemisia tabaci* colectados en Guatemala (Rosario *et al.*, 2015) e inicialmente se le asignó el nombre de “VEM (Vector-enabled metagenomic) begomovirus 3”, por ser una especie de begomovirus que no se detectó en un hospedante vegetal, y porque se extrajo y secuenció directamente de insectos vectores. En The Online 10th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses “https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae/479/member-species-begomovirus” a este virus se le asignó el nombre de *Whitefly-associated begomovirus 3*. Por considerar que el *Whitefly-associated begomovirus 3* contiene la organización genómica y capacidad codificante típica de los begomovirus (Rosario *et al.*, 2015) y, con base en su detección en plantas de jamaica y la secuenciación completa del DNA-A y DNA-B, en nuestra investigación se propone el nombre de *Jamaica yellow mosaic virus* para el *Whitefly-associated begomovirus 3*.

CONCLUSIONES

Los begomovirus *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV), *Sida golden mosaic Honduras virus* (SGMHV) y *Whitefly-associated begomovirus 3* se encontraron en el estado de Guerrero, México, en plantas de jamaica asociados con síntomas de aclaramiento de nervaduras, manchas cloróticas, mosaico, clorosis

infectada con *Ludwigia leaf distortion betasatellite*, *Cotton leaf curl Multan betasatellite* (Das *et al.*, 2008), *Tomato leaf curl Joydebpur betasatellite* (Paul *et al.*, 2008) and *Mesta yellow vein mosaic virus* (Chatterjee *et al.*, 2007).

OYMMV was detected for the first time in okra (*Abelmoschus esculentus*) in the state of Guerrero, Mexico, in plants with symptoms of yellowing, spotting and foliar distortion (De la Torre *et al.*, 2006). Next, it was reported in Texas, U.S. (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2010); and thereafter in the state of Guerrero, Mexico, it was found in Roselle plants (*H. sabdariffa*) (Velázquez *et al.*, 2016). In the present investigation, this virus was associated with Roselle plants that presented veins discoloration. *Sida golden mosaic Honduras virus* (SiGMHV) was first reported in Honduras in *Sida rhombifolia*, which is a species with wide distribution in Central America (Frischmuth *et al.*, 1997) and it had not been detected in any other plant species.

Whitefly-associated begomovirus 3 was detected in adults of *Bemisia tabaci* collected in Guatemala (Rosario *et al.*, 2015) and initially the name of “VEM (Vector-enabled metagenomic) begomovirus 3” was assigned to it, for being a species of begomovirus that was not detected in a plant host, and because it was extracted and sequenced directly from vector insects. In The Online 10th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses “https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae/479/member-species-begomovirus”, the name *Whitefly-associated begomovirus 3* was assigned to this virus. Considering that *Whitefly-associated begomovirus 3* contains the genomic organization and codifying capacity typical of the begomoviruses (Rosario *et al.*, 2015), and based on its detection in Roselle plants and the complete sequencing of the DNA-A and DNA-B in our research, we propose the name *Jamaica yellow mosaic virus* for the *Whitefly-associated begomovirus 3*.

CONCLUSIONS

The begomoviruses *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV), *Sida golden mosaic Honduras virus* (SGMHV) and *Whitefly-associated begomovirus 3* were found in the state of Guerrero, Mexico, in Roselle plants; associated with symptoms of veins discoloration, chlorotic spots, mosaic, interveinal

intervenial y amarillamiento, respectivamente. De ellos, el SGMHV y el *Whitefly-associated begomovirus 3* se detectaron por primera vez en esta especie vegetal; *Jamaica yellow mosaic virus* se propone como nombre para este último.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto “Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento, tolerante a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentables” Clave: 163972 del FONDO SECTORIAL SAGARPA-CONACYT por financiar parcialmente el presente estudio. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de postgrado de Erika J. Zamora Macorra.

LITERATURA CITADA

- Briddon R.W., S.E. Bull, I. Amin, A.M. Idris, S. Mansoor, I. D. Bedford, P. Dhawan, N. Rishi, S. S. Siwatch, A. M. Abdel-Salam, J. K. Brown, Y. Zafar, and P. G. Markham. 2003. Diversity of DNA β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* 312: 106-121.
- Brown J. K., A. M. Idris, and D. C. Fletcher. 1993. *Sinaloa tomato leaf curl virus*, a newly described geminivirus of tomato and pepper in west coastal Mexico. *Plant Dis.* 77: 1262.
- Chatterjee A., S. K. Sinha, A. Roy, D. N. Sengupta, and S. Ghosh. 2007. Development of diagnostics for DNA A and DNA B of a begomovirus associated with mesta yellow vein mosaic disease and detection of geminiviruses in mesta (*Hibiscus cannabinus* L. and *H. sabdariffa* L.) and some other plant species. *J. Phytopathol.* 155: 683-689.
- Das S., A. Roy, R. Ghosh, S. Paul, S. Acharyya, and S. K. Ghosh. 2008. Sequence variability and phylogenetic relationship of betasatellite isolates associated with yellow vein mosaic disease of Mesta in India. *Virus Genes* 37:414-424.
- De La Torre A., R., A. Monsalvo R., and A. Romero R. 2006. A new begomovirus inducing yellow mottle in okra crops in Mexico is Related to Sida yellow vein virus. *Plant Dis.* 90: 378.
- Frischmuth T., M. Engel, S. Lauster and H. Jeske. 1997. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, Sida-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *J. Gen. Virol.* 78: 2675–2682.
- García A., S., D.M. Tomás, S. Sánchez C., J. Navas C., and E. Moriones. 2007. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology* 365: 210–219.
- Hernandez-Zepeda Z., C., A. T. Isakeit Scott Jr., and J. K. Brown. 2010. First report of *Okra yellow mosaic Mexico virus* in Okra in the United States. *Plant Dis.* 94: 924.
- Khan J.A. 2000. Detection of *Tomato leaf curl geminivirus* in its vector *Bemisia tabaci*. *Indian J. Exp. Biol.* 38:512–515.
- Leke W. N., D.B. Mignouna, J. K. Brown, and A. Kvarnheden. 2015. Begomovirus disease complex: emerging threat to vegetable production systems of West and Central Africa. *Agr. Food Secur.* 4: 1.
- Luan J. B., X. W. Wang, J. Colvin and S. S. Liu. 2014. Plant-mediated whitefly–begomovirus interactions: research progress and future prospects. *B. Entomol. Res.* 104: 267-276.
- Mansoor S., R. W. Briddon, Y. Zafar, and J. Stanley. 2003. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends Plant Sci.* 8: 128–134.
- Paul S., A. Roy, R. Ghosh, S. Das, S. Chaudhuri, and S. K. Ghosh. 2008. Molecular characterization and sequence variability of betasatellites associated with leaf curl disease Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from different geographic locations of India. *Acta Virol.* 52:251-256.
- Polston J. E., and P. K. Anderson. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Dis.* 81:1358–1369.
- Rojas A., A. Kvarnheden, D. Marcenaro, and J. P. T. Valkonen. 2005. Sequence characterization of *Tomato leaf curl Sinaloa virus* and *Tomato severe leaf curl virus*: phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination. *Arch. Virol.* 150: 1281–1299.
- Rosario K., Y. M. Seah, C. Marr, A. Varsani, S. Kraberger, D. Stainton, E. Moriones, J. E. Polston, S. Duffy, and M. Breitbart. 2015. Vector-enabled metagenomic (VEM) surveys using whiteflies (Aleyrodidae) reveal novel begomovirus species in the New and Old Worlds. *Viruses* 7: 5553-5570.
- Salinas M., Y., A. R. E. Zúñiga H., L.B. Jiménez De la T., V. Serrano A., y V. C. Sánchez F. 2012. Color en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 18: 395-407.
- Sanz A. I., A. Fraile, F. García A., X. Zhou, D. J. Robinson, S. Khalid, T. Butt, and B. D. Harrison. 2000. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *J. Gen. Virol.* 81: 1839-1849.
- Scholthof K. G., S. Adkins, H. Czosnek, P. Palukaitis, E. Jacquot, T. Hohn, B. Hohn, K. Saunders, T. Candresse, P. Ahlquist, C. Hemenway, and G. D. Foster. 2011. Review. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 12: 938-954.
- SIAP, Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. www.siap.gob.mx (Consulta: junio 2018).

—End of the English version—

-----*-----

Varma A., and V. G. Malathi. 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annal. Appl. Biol.* 142:145–164.

Velázquez F., P., E. J. Zamora M., D. L. Ochoa M., G. Negrete F., y J. Hernández M. 2016. Virus associated to yellowing of *Hibiscus sabdariffa* in Guerrero, Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* 34: 200-207.