

Evaluation of seed transmission of begomoviruses in roselle and roselle-associated weeds

Evaluación de la transmisión de begomovirus por semilla de jamaica y malezas asociadas

Candelario Ortega-Acosta, Daniel L. Ochoa-Martínez*, Javier Hernández-Morales, Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 56230. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México; Sergio Ramírez-Rojas, Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. Km 0.5 Carretera Zacatepec-Galeana. Colonia Centro Zacatepec, Morelos; Jorge A. Gutiérrez-Gallegos, Herbario JES, Área de Biología, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, 56230, Estado de México.

*Correspondence author ldaniel@colpos.mx.

Recibido: 20 de Junio, 2018.

Aceptado: 12 de Octubre, 2018.

Ortega-Acosta C, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J, Ramírez-Rojas S and Gutiérrez-Gallegos JA. 2018. Evaluation of seed transmission of begomoviruses in roselle and roselle-associated weeds. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1806-3

Primera publicación DOI: 23 de Octubre, 2018.

First DOI publication: October 23, 2018.

Resumen. En el estado de Guerrero, México, los begomovirus *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) y *Whitefly-associated begomovirus 3* (WfaBV3) se han encontrado asociados al cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). El objetivo de este estudio fue conocer si OYMMV y WfaBV3 pueden infectar malezas presentes en cultivos comerciales de esta especie y si se transmiten por semilla. En 2016, se recolectaron plantas de jamaica y malezas con síntomas de amarillamiento y mosaico en Guerrero. Se extrajo DNA total y se realizó PCR

Abstract. In the state of Guerrero, Mexico, the begomoviruses *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) and *Whitefly-associated begomovirus 3* (WfaBV3) have been found in association with roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). The objective of this study was to determine if OYMMV and WfaBV3 can infect weeds commonly found in roselle commercial crops and if they are seed-transmitted. Roselle plants and weeds showing yellowing and mosaic were collected in Guerrero in 2016. Using universal primers for begomoviruses and specific primers for the 18s rRNA gene as an internal control, total DNA was analyzed by PCR. Begomovirus positive samples were later analyzed with primers specific for OYMMV and WfaBV3. One hundred of the roselle and weed seeds collected from symptomatic plants was analyzed for begomoviruses by PCR; 100 seeds from each roselle cultivar and 40 seeds from each weed were planted in seedling beds. Young leaves of roselle seedlings were analyzed by PCR after circular DNA amplification by the Rolling Circle. The

con iniciadores universales para begomovirus y específicos para el gen 18s rRNA como control interno. Las muestras positivas se analizaron posteriormente con iniciadores específicos para OYMMV y WfaBV3. Cien semillas de jamaica y de malezas que presentaban síntomas se analizaron por PCR para begomovirus; cien semillas de cada cultivar de jamaica y 40 semillas de cada maleza se sembraron en almácigos para obtener plántulas. Hojas jóvenes de las plántulas de jamaica se analizaron por PCR después de la amplificación de DNA por círculo rodante. En plantas maduras de jamaica se detectó a WfaBV3 y OYMMV. En *Sida collina*, *S. aggregata*, *S. acuta*, *S. haenkeana* y *Malacra fasciata* se detectó al OYMMV en planta madura, semilla y plántulas. Este es el primer reporte de cuatro nuevos hospedantes del OYMMV y su transmisión por semilla.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, *Whitefly-associated begomovirus 3*, amplificación por círculo rodante.

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es afectada por virus del género Begomovirus (*Geminiviridae*), los cuales poseen un genoma circular de DNA, monopartita (DNA-A) o bipartita (DNA-A y DNA-B), infectan una amplia gama de especies vegetales y se transmiten por un complejo de especies crípticas de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) (Brown *et al.*, 2015). Entre las especies de begomovirus asociadas a jamaica se encuentran: *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuV), *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV), *Hibiscus variegation virus* (HiVV, nombre provisional) (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007; Chatterjee y Ghosh, 2008; Muhammad *et al.*, 2017) y *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV). Este último se reportó recientemente en el estado de Guerrero, México, asociado con el

WfaBV3 and OYMMV were detected in roselle mature plants and in the weed species *Sida collina*, *S. aggregata*, *S. acuta*, *S. haenkeana* and *Malacra fasciata*, OYMMV was detected in mature plants, in seeds and in seedlings. This is the first report of four new hosts for OYMMV and its transmission by seed.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, *Whitefly-associated begomovirus 3*, Rolling Circle Amplification.

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) is known to be affected by viruses in the genus Begomovirus (*Geminiviridae*), which possess a circular monopartite (DNA-A) or a bipartite DNA genome (DNA-A and DNA-B), infect a wide range of plant species and are transmitted by a complex of cryptic species of whiteflies (*Bemisia tabaci*) (Brown *et al.*, 2015). Among the begomovirus species that have been reported in association with roselle are: *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuV), *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV), *Hibiscus variegation virus* (HiVV, provisional name) (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007; Chatterjee and Ghosh, 2008; Muhammad *et al.*, 2017) and *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV). The latter was recently reported in the state of Guerrero, Mexico in association with yellowing of roselle at incidences of up to 90 to 100 % (Velázquez *et al.*, 2016). This virus was also detected in *Abutilon permolle*, *Corchorus siliquosus* and *Sida acuta* in Yucatán, Mexico (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). In addition to infecting cultivated plants, begomoviruses can also infect weeds. Weeds are a potential reservoir of economically important viruses and different host weeds are crucial in the epidemiology of begomoviruses (Prajapat *et al.*, 2014); additionally, several of them can transmit

amarillamiento de la jamaica con incidencias del 90 al 100% (Velázquez *et al.*, 2016). Este virus también fue detectado en *Abutilon permolle*, *Corchorus siliquosus* y *Sida acuta* en Yucatán, México (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). Además de infectar especies cultivadas, los begomovirus también pueden infectar malezas. Las malezas son un reservorio potencial de virus económicamente importantes y varias de ellas son cruciales en la epidemiología de los begomovirus (Prajapat *et al.*, 2014); además, varias pueden transmitir virus por semilla (Dikova, 2005; Sharman *et al.*, 2009). *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV, un virus de DNA) en camote dulce (*Ipomoea batatas*) (Kim *et al.*, 2015), *Mung bean yellow mosaic virus* (MYMV, un virus de DNA) en *Vigna mungo* (Kothandaraman *et al.*, 2016) y el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV, un virus de DNA) en tomate (*Solanum lycopersicum*) (Kil *et al.*, 2016) son transmitidos por semilla. En Guerrero, una alta incidencia de plantas de jamaica con amarillamiento o mosaico estuvo asociada con la infección de OYMMV (Velázquez *et al.*, 2016) y *Whitefly-associated begomovirus 3*, respectivamente, ambos con genoma bipartita. Asimismo, diferentes malezas asociadas al cultivo presentaban amarillamiento pero se desconoce si son hospedantes de estos begomovirus o si se transmiten por semilla. Por lo anterior, el propósito de este estudio fue determinar si los begomovirus detectados en plantas de jamaica también se encuentran en las malezas asociadas al cultivo y si se transmiten por semilla. En agosto y noviembre de 2016 se recolectaron plantas de tres cultivares de jamaica con síntomas de amarillamiento o mosaico de un cultivo comercial en Guerrero, México. También se recolectaron malezas que se encontraban en el interior o en la periferia del cultivo que mostraban amarillamiento y distorsión foliar. Como testigo también se colectaron plantas asintomáticas de jamaica y malezas; estas últimas

viruses by seed (Dikova, 2005; Sharman *et al.*, 2009). *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV, a DNA virus) in sweet potato (*Ipomoea batatas*) (Kim *et al.*, 2015), *Mung bean yellow mosaic virus* (MYMV, a DNA virus) in *Vigna mungo* (Kothandaraman *et al.*, 2016) and of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV, a DNA virus) in tomato (*Solanum lycopersicum*) (Kil *et al.*, 2016) are transmitted by seed. In Guerrero, a high incidence of roselle plants showing yellowing or mosaic were infected with OYMMV (Velázquez *et al.*, 2016) and *Whitefly-associated begomovirus 3*, respectively, both with bipartite genome. Additionally, different weeds associated to the crop show yellowing but it is unknown if they are hosts of these begomoviruses or if they are transmitted by seed. The purpose of this study was to determine if begomoviruses detected in roselle plants are also found in weeds associated to the crop and if they are transmitted by seed. During August and November of 2016, roselle plants of three cultivars with yellowing or mosaic symptoms were collected from a commercial field in Guerrero, Mexico. Weeds showing yellowing and foliar distortion were also collected from inside and on the periphery of the field. Asymptomatic plants of both roselle and the weeds were collected as controls, and weeds were identified at the species level. Total nucleic acids were extracted from young roselle and weed leaves with Concert™ Plant RNA Reagent (Cat. 12322-012, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Universal primers for begomoviruses Av494 (5'-GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG-3') and Ac1048 (5'-GGRTTDGARGCATGHG TACATG-3') were used to amplify a 550 bp fragment of the protein coat (CP) gene (Wyatt and Brown 1996). The reaction mixture consisted of 2 µL of reaction buffer (5X Green GoTaq®), 0.6 µL of MgCl₂ (25 mM), 0.2 µL of dNTPs (10 mM), 0.55 µL (10 µM) of each begomovirus primer,

se identificaron a especie. Se extrajeron ácidos nucleicos totales de hojas jóvenes de jamaica y malezas con el reactivo Concert[™] Plant RNA Reagent (Cat. 12322-012, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los iniciadores universales para begomovirus Av494 (5'-GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG-3') y Ac1048 (5'-GGRTTDGARGCATGHGTAC ATG-3') para amplificar un fragmento de 550 pb de la cubierta proteica (CP) (Wyatt y Brown 1996). La mezcla de reacción consistió en 2 µL de buffer de reacción (5X Green GoTaq[®]), 0.6 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.2 µL de dNTPs (10 mM), 0.55 µL (10 µM) de cada iniciador, 0.05 µL (10 µM) de cada iniciador del gen 18s rRNA utilizado como indicador de la efectividad de la PCR que amplifican un fragmento de 844pb (Gambino y Gribaudo 2006), 4.9 µL de agua ultra pura, 0.1 µL de GoTaq[®] DNA Polymerase (5U/µL PROMEGA) y 1 µL de ácidos nucleicos totales (20 ng / µL) en un volumen final de 10 µL. La PCR se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C/4 min, seguida de 30 ciclos a 95 °C/1 min, 55 °C/2 min, 72 °C/1 min y una extensión final de 72 °C/10 min. Los productos obtenidos de PCR se secuenciaron (Macrogen Inc., Corea), las secuencias fueron editadas con el programa DNA baser (<http://www.dnabaser.com/index.html>) y se compararon con las de la base de datos del GenBank[®]. Las muestras de jamaica y malezas positivas a begomovirus por PCR se sometieron a un segundo análisis con iniciadores específicos para WfaBV3 y OYMMV utilizando la secuencia de la CP de cada virus (KT099127.1 y HM035059.1). Con el programa Primer-blast tool del NCBI se diseñaron los iniciadores específicos VEM-3-F 5'-AGTCCTACGAGCAACGTCAC-3'/ VEM-3-R 5'-TCTCGTACTTCGCAGCTTCC-3' y OYMMV-F 5'-AAAGGTGAGCCGCAATGC TA-3'/ OYMMV-R 5'- GTCGCGTAGGTCGTTCT TCA-3', que amplifican un fragmento de 438 y

0.05 µL (10 µM) of each 18s rRNA gene primer that amplify an 844bp fragment as an indicator of PCR effectiveness (Gambino and Gribaudo 2006), 4.9 µL ultra-pure water, 0.1 µL GoTaq[®] DNA Polymerase (5U/µL PROMEGA) and 1 µL DNA (20 ng / µL) in a final volume of 10 µL. PCR was done with the following conditions: initial denaturation at 95 °C/4 min, followed by 30 cycles at 95 °C/1 min, 55 °C/2 min, 72 °C/1 min and a final extension of 72 °C/10 min. The PCR products obtained were sequenced (Macrogen Inc., Korea), the sequences were edited with DNA baser (<http://www.dnabaser.com/index.html>) and they were compared with those from the GenBank[®] database. The samples of roselle and weeds positive to begomovirus by PCR were subjected to a second analysis with specific primers for WfaBV3 and OYMMV by using the sequence of the CP of each virus (KT099127.1 and HM035059.1). Specific primers were designed with the NCBI primer-blast tool: VEM-3-F 5'-AGTCCTACGAGCAACGTCAC-3'/ VEM-3-R 5'-TCTCGTACTTCGCAGCTTCC-3' and OYMMV-F 5'-AAAGGTGAGCCGCAA TGCTA-3'/ OYMMV-R 5'- GTCGCGTAGG TCGTTCTTCA-3', which amplified a product size of 438 and 463 bp, respectively. The reaction mixture consisted of 2 µL reaction buffer (5X Green GoTaq[®]), 0.6 µL of MgCl₂ (25 mM), 0.2 µL of dNTPs (10 mM), 0.6 µL (10 µM) of each primer, 4.9 µL of ultra-pure water, 0.1 µL of GoTaq[®] DNA Polymerase (5U/µL PROMEGA) and 1 µL of DNA (20 ng/µL) in a final volumen of 10 µL. PCR was performed as follows: initial denaturation at 95 °C/5 min, 40 cycles at 95 °C/30 s, 57 °C/30 s, 72 °C /30 s and a final extension cycle of 72 °C/5 min for both viruses. Three samples of roselle positive to OYMMV and three positive to WfaBV3, as well as five weeds positive to OYMMV were sequenced (Macrogen Inc., Korea). To corroborate the specificity of the viruses, tomato plants infected

463 pb, respectivamente. La mezcla de reacción consistió en 2 µL de buffer de reacción (5X Green GoTaq®), 0.6 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.2 µL de dNTPs (10 mM), 0.6 µL (10 µM) de cada iniciador, 4.9 µL de agua ultra pura, 0.1 µL de GoTaq® DNA Polymerase (5U/µL PROMEGA) y 1 µL de DNA (20 ng/µL) en un volumen final de 10 µL. El programa de PCR para ambos virus fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C/5 min, seguida de 40 ciclos a 95 °C/30 s, 57 °C/30 s, 72 °C/30 s y un ciclo de extensión final de 72 °C/5 min. Tres muestras de jamaica positivas al OYMMV y tres positivas al WfBV3, así como cinco malezas positivas al OYMMV fueron secuenciadas (Macrogen Inc., Corea). Para corroborar la especificidad de los iniciadores diseñados, plantas de tomate infectadas con el *Tomato severe leaf curl virus* y plantas de chile infectadas con el *Pepper golden mosaic virus* o *Pepper huasteco yellow vein virus* respectivamente, se analizaron mediante PCR con VEM-3-F/VEM-3-R y OYMMV-F/OYMMV-R. Se recolectaron y analizaron semillas de cada uno de los tres cultivares de jamaica y de cinco especies de malezas positivas a begomovirus de la siguiente manera: a) Se extrajeron ácidos nucleicos totales de 10 muestras de semillas de cada cultivar de jamaica (10 semillas por muestra) y cuatro muestras de semillas de cada maleza (10 semillas por muestra) y se analizaron por PCR con los iniciadores universales para begomovirus como se describió anteriormente. Asimismo, la semilla de maleza se analizó por PCR con iniciadores específicos para OYMMV. b) Se sembraron 100 semillas de cada cultivar de jamaica y 40 semillas de cada una de las cinco malezas en charolas que contenían suelo estéril. Para evitar la contaminación de algún virus presente en la testa, las semillas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 10% y se enjuagaron con agua destilada (Kim *et al.*, 2015). Las charolas se mantuvieron

with *Tomato severe leaf curl virus* and pepper plants infected with either *Pepper golden mosaic virus* or *Pepper huasteco yellow vein virus*, respectively, were analyzed by PCR with both VEM-3-F/VEM-3-R and OYMMV-F/OYMMV-R. Seeds from each of three roselle cultivars and from five weed species tested positive to begomoviruses were collected and analyzed as follows: a) Total nucleic acids were extracted from 10 seed samples of each roselle cultivar (10 seeds per sample) and four seed samples of each weed (10 seeds per sample too) and analyzed by PCR with universal primers for begomoviruses as previously described. In addition, the weed seed was analyzed with specific primers for OYMMV. b) One hundred seeds from each roselle cultivar and 40 seeds from each of the five weeds were planted in trays containing sterile soil. To avoid contamination by a virus present on the seed coat, seeds were surfaced sterilized with 10% sodium hypochlorite and rinsed with distilled water (Kim *et al.*, 2015). The trays were kept at 27° C and a 16 h photoperiod (Albrechtsen 2006). As controls, 200 seeds of each roselle cultivar were sown from roselle plants that were negative to begomoviruses. Three months after seeding, young leaves were harvested and total nucleic acids were extracted from ten of seedlings of each roselle cultivar. In the case of the weeds, young leaves of ten seedlings of each of the five species were randomly selected at 40 days after seeding. Roselle and weed seedlings were analyzed by PCR with universal primers for begomoviruses as described previously. Additionally, young leaves of weeds seedlings were analyzed with specific primers to OYMMV. Extraction of total nucleic acids from seeds and seedlings was performed according to Dellaporta *et al.* (1983), with some modifications. The products were sequenced, edited and compared with those at the GenBank® database as previously described. Total nucleic acids from young leaves

a 27 °C con un fotoperiodo de 16 h (Albrechtsen 2006). Como testigo, se sembraron 200 semillas de cada cultivar de jamaica colectadas de plantas sanas. Tres meses después de la siembra, se recolectaron hojas jóvenes de 10 plántulas de cada cultivar de jamaica y se extrajeron ácidos nucleicos totales. En el caso de las malezas, se colectaron hojas jóvenes de diez plántulas seleccionadas al azar de cada una de las cinco especies 40 días después de la siembra. Las plántulas de jamaica y de malezas se analizaron mediante PCR con iniciadores universales para begomovirus como se describió anteriormente. Además, las hojas jóvenes de plántulas de malezas se analizaron con iniciadores específicos para OYMMV. La extracción de ácidos nucleicos totales de semillas y plántulas se realizó de acuerdo con Dellaporta *et al.* (1983), con algunas modificaciones. Los productos se secuenciaron, editaron y compararon con los de la base de datos del GenBank® de la manera antes indicada. Los ácidos nucleicos totales de las hojas jóvenes de las plántulas de jamaica se sometieron a amplificación por círculo rodante con el kit TempliPhi 100 Amplification® (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante con el fin de enriquecer el DNA circular que pudiera estar presente y se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

En total se recolectaron 34 plantas de jamaica con amarillamiento o mosaico y 10 asintomáticas así como seis malezas con amarillamiento y distorsión foliar (Figura 1) y seis sin síntomas. Todas las plantas de jamaica con síntomas amplificaron el fragmento esperado (550 pb) para begomovirus y 26 de ellas tuvieron una similitud de 97-98% con el *Whitefly-associated begomovirus 3* (WfaBV3) (números de acceso MF632074, MF632075, MF632076 y MF632077). Estas 26 plantas de jamaica con síntomas se analizaron también por PCR con los iniciadores VEM-3-F/VEM-3-R y

of roselle seedlings were subjected to RCA with the TempliPhi 100 Amplification® kit (Amersham Biosciences) following the manufacturer's instructions with the purpose of enriching the circular DNA that could be present and verified by 0.8% agarose gel electrophoresis.

A total of 34 roselle plants with yellowing or mosaic and 10 with no symptoms were collected. Additionally, six weeds with yellowing and foliar distortion (Figure 1) and six with no symptoms were collected. All symptomatic roselle plants amplified the expected fragment (550 bp) for begomovirus and 26 of them had a similarity of 97-98% with *Whitefly-associated begomovirus 3* (WfaBV3) (Accession number MF632074, MF632075, MF632076 and MF632077). These 26 symptomatic roselle plants were analyzed by PCR with VEM-3-F/VEM-3-R primers and all amplified the expected product of 438 bp. Sequence of the latter (Accession number MH090700) had a similarity of 98% with *Whitefly-associated begomovirus 3*. Rosario *et al.* (2015) reported this begomovirus in *Bemisia tabaci* and it was named VEM-begomovirus 3 because it had not previously been detected in plant species, however, the name of this species at the present time accepted by the ICTV is *Whitefly-associated begomovirus 3*. The remaining eight plants showed a 93-94% similarity with OYMMV (Accession number MF315084, MF315085, MF315086 and MF315087). These eight symptomatic roselle plants were analyzed by PCR with OYMMV-F/OYMMV-R primers and all amplified the expected product of 463 bp. Sequence of the latter (Accession number MH090684) had a similarity of 92% with OYMMV, a virus previously reported by Velázquez *et al.* (2016) in roselle cultivars in the same area. In the case of begomoviruses it has been established that a sequence with a similarity $\geq 91\%$ with the whole genome or part of the DNA-A component, it means that it is the same species,

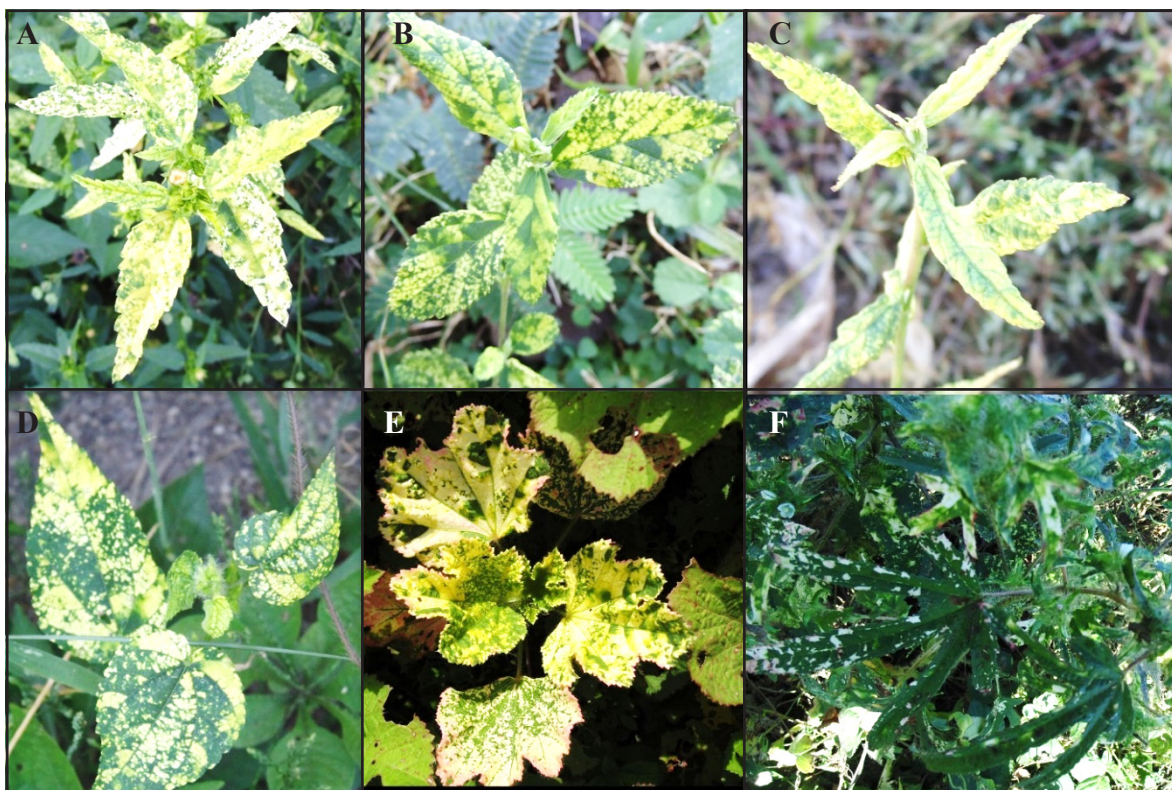


Figura 1. Síntomas de malezas asociadas al cultivo de jamaica. A) *Sida acuta*, B) *S. haenkeana*, C) *S. collina*, D) *S. aggregata*, E, F) *Malachra fasciata*.

Figure 1. Symptoms in weeds associated to a roselle crop. A) *Sida acuta*, B) *S. haenkeana*, C) *S. collina*, D) *S. aggregata*, E, F) *Malachra fasciata*.

todas amplificaron el producto esperado de 438 pb. La secuencia de este último (número de acceso MH090700) tuvo una similitud del 98% con el *Whitefly-associated begomovirus 3*. Rosario *et al.* (2015) reportaron este begomovirus en *Bemisia tabaci* y lo denominaron VEM-begomovirus 3 ya que no se había detectado previamente en plantas, sin embargo, el nombre de esta especie actualmente aceptado por el ICTV es *Whitefly-associated begomovirus 3*. Las ocho plantas restantes mostraron una similitud del 93-94% con el OYMMV (número de acceso MF315084, MF315085, MF315086 y MF315087). Estas ocho plantas de jamaica se analizaron mediante PCR con los iniciadores OYMMV-F / OYMMV-R

whereas if it has a similarity <91% then it should be considered a new species (Brown *et al.*, 2015). The CP gene is the most highly conserved gene in the family *Geminiviridae* (Wyatt and Brown 1996). This gene sequence, which effectively predicts discrete strains, species, and taxonomic lineages of begomoviruses, has been accepted by the ICTV as a desirable marker for virus identity when a full-length genomic sequence is not available (Brown *et al.*, 2001). There was no amplification with primers VEM-3-F/VEM-3R and OYMMV-F/OYMMV-R in the tomato sample infected with *Tomato severe leaf curl virus* nor in the pepper plants infected with *Pepper golden mosaic virus* and *Pepper huasteco yellow vein virus*, respectively. Roselle

y todas amplificaron el producto esperado de 463 pb. La secuencia de este último (número de acceso MH090684) tuvo una similitud de 92% con OYMMV, un virus reportado previamente por Velázquez *et al.* (2016) en el cultivo de jamaica en la misma zona de estudio. En el caso de los begomovirus, se ha establecido que la secuencia de una especie con una similitud $\geq 91\%$ con todo el genoma o parte del componente DNA-A, significa que se trata de la especie en cuestión, mientras que si se tiene una similitud $< 91\%$, entonces debe considerarse una especie nueva (Brown *et al.*, 2015). El gen de la CP es el mejor conservado de la familia *Geminiviridae* (Wyatt y Brown 1996) y permite discriminar efectivamente variantes, especies y otras categorías taxonómicas de begomovirus, por lo que ha sido aceptada por el ICTV como una referencia confiable para identificar un virus cuando no se dispone de la secuencia completa de su genoma (Brown *et al.*, 2001). No hubo amplificación con los iniciadores VEM-3-F/VEM-3R y OYMMV-F/OYMMV-R en plantas de tomate infectadas con el *Tomato severe leaf curl virus* ni en plantas de chile infectadas con el *Pepper golden mosaic virus* y *Pepper huasteco yellow vein virus*, respectivamente. Las plantas de jamaica positivas a OYMMV inicialmente mostraron clorosis en la nervadura y luego un mosaico amarillo que cubrió toda la hoja. En el caso de las plantas de jamaica positivas a WfaBV3, siempre se observó un mosaico que se hizo más evidente con el tiempo. Se identificaron seis especies de malezas asociadas a jamaica pertenecientes a dos familias, siendo la familia *Malvaceae* la que tuvo el mayor número de especies: *Sida aggregata* K., *S. collina* S., *S. haenkeana* (C.) Presl., *S. acuta* Burm. f., *Malachra fasciata* Jacq. y *Euphorbia heterophylla* L. Estos resultados son similares a los reportados en otros estudios en los que se han encontrado diferentes begomovirus asociados con malezas que pertenecen

plants positive to OYMMV initially showed venial chlorosis and then a yellow mosaic that covered the entire leaf surface. In the case of the roselle plants positive for WfaBV3, a mosaic was always observed and it became more evident over time. Six weed species belonging to two families associated with roselle were identified, with the *Malvaceae* family having the highest number of species: *Sida aggregata* K., *S. collina* S., *S. haenkeana* (C.) Presl., *S. acuta* Burm. f., *Malachra fasciata* Jacq. and *Euphorbia heterophylla* L. These results are similar to those reported in other studies in which different begomoviruses associated with weeds belonging to the *Malvaceae* family have been found (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2016). The expected fragment for begomoviruses (550 bp) was amplified from all symptomatic weed samples, as well as that of the 18s rRNA gene (844 bp) used as the internal control; the latter is essential for the detection of false negatives, DNA degradation or presence of inhibitors in the PCR (Gambino and Gribaudo 2006). In *Sida aggregata*, *S. collina*, *S. haenkeana*, *S. acuta* and *Malachra fasciata* expected PCR product of 463 bp obtained with primers OYMMV-3-F/OYMMV-3-R was observed (Data not shown) and their sequences were 93 to 95 % similar for OYMMV. In *Euphorbia heterophylla* the begomovirus *Euphorbia mosaic virus* was detected. From the positive weeds to OYMMV, only *Sida acuta* had previously been reported as a host of this virus (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007), while, *S. aggregata*, *S. collina*, *S. haenkeana* and *Malachra fasciata* are reported for the first time as hosts. Most of the weeds have a high adaptability to the environment and several of them, have been reported as hosts of a large number of begomoviruses and they are considered an important factor in epidemiological studies (Prajapat *et al.*, 2014). In addition, to know the range of alternative virus hosts is essential for

a la familia *Malvaceae* (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2016). El fragmento esperado para begomovirus (550 pb) se obtuvo en todas las muestras de malezas con síntomas, así como el del fragmento del gen 18s rRNA (844 pb) utilizado como control interno; este último es esencial para la detección de falsos negativos, degradación del DNA o presencia de inhibidores de la PCR. (Gambino y Gribaudo 2006). En *Sida aggregata*, *S. collina*, *S. haenkeana*, *S. acuta* y *Malachra fasciata* se obtuvo el producto esperado de PCR de 463 pb con los iniciadores OYMMV-3-F / OYMMV-3-R (datos no mostrados) y sus secuencias tuvieron de 93 a 95% de similitud con el OYMMV. En *Euphorbia heterophylla* se detectó al begomovirus *Euphorbia mosaic virus*. De las malezas positivas al OYMMV, solo *Sida acuta* se había reportado previamente como hospedante de este virus (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007), mientras que *S. aggregata*, *S. collina*, *S. hankeana* y *Malacra fasciata* se reportan por primera vez como hospedantes. La mayoría de las malezas tienen una alta adaptabilidad al ambiente y varias de ellas se han reportado como hospedantes de un gran número de begomovirus por lo que se consideran un factor importante en estudios epidemiológicos (Prajapat *et al.*, 2014). Además, conocer la gama de hospedantes alternos de virus es esencial para diseñar estrategias efectivas de manejo (Kai-Shu *et al.*, 2011). La transmisión del OYMMV por semilla de malezas favorece su permanencia en campo y las plántulas que se originan de ellas son un reservorio potencial para colonias de moscas blancas virulíferas en las primeras etapas del cultivo. Ninguna de las especies de malezas analizadas en el presente estudio fue positiva a WfaBV3 a pesar de que este virus se detectó en plantas de jamaica con mosaico. Es posible que WfaBV3 esté limitado al género *Hibiscus*, como en el caso de SPLCV que se encontró únicamente en plantas del género

designing effective virus management strategies (Kai-Shu *et al.*, 2011). Transmission of OYMMV by seed of weeds favoring its continuous permanence in the field and seedlings originated from them are a potential reservoir for viruliferous whitefly colonies in the early stages of the crop. None of the weed species analyzed in the present study was positive to WfaBV3 though this virus was detected in roselle plants with mosaic. It is possible that WfaBV3 might be limited to the *Hibiscus* genus, like in the case of SPLCV, which was found only in plants of the *Ipomoea* genus from a total of 111 species belonging to 30 families (Kai-Shu *et al.*, 2011). WfaBV3 and OYMMV were not detected by PCR in the different roselle cultivars in both seeds and seedlings and only amplification of the 18s rRNA gene was obtained, so false negatives or the presence of PCR inhibitors were excluded. No amplification was obtained by RCA, which supports the previous results of non-transmission of these begomoviruses by roselle seed. These results differ from those obtained for the begomoviruses *Sweet potato leaf curl virus* and *Mung bean yellow mosaic virus* that were detected in asymptomatic seedlings by PCR; however, in the field such seedlings may be permissive and act as a source of inoculum for the infection of healthy seedlings (Kim *et al.*, 2015; Kothandaraman *et al.*, 2016). OYMMV was detected in seed of *Sida aggregata* (Accession MF632078, MH090690), *S. collina* (Accession MF632079, MH090691), *S. haenkeana* (Accession MF632080, MH090692), *Sida acuta* (Accession MF632081, MH090693) and *Malachra fasciata* (Accession MF632082, MH090694) with both universal primers for begomoviruses and specific primers for OYMMV. OYMMV was detected by PCR with OYMMV-3-F/OYMMV-3-R primers in seedlings of the five weed species in different relative rate (positive seedlings/analyzed seedlings; Accession number): *Sida aggregata*

Ipomoea de un total de 111 especies pertenecientes a 30 familias (Kai-Shu *et al.*, 2011). WfaBV3 y OYMMV no se detectaron por PCR en semilla y plántulas de los diferentes cultivares de jamaica y sólo se obtuvo la amplificación del segmento del gen 18s rRNA, por lo que se descarta la posibilidad de falsos negativos o la presencia de inhibidores de PCR. No se obtuvo ninguna amplificación a partir de ACR, lo que respalda los resultados anteriores de la no transmisión de estos begomovirus por semilla de jamaica. Estos resultados difieren de los obtenidos para los begomovirus *Sweet potato leaf curl virus* y *Mung bean yellow mosaic virus* que se detectaron por PCR en plántulas asintomáticas; sin embargo, en campo, éstas pueden ser permisivas y actuar como una fuente de inóculo para la infección de plántulas sanas (Kim *et al.*, 2015; Kothandaraman *et al.*, 2016). El OYMMV fue detectado en semilla de *Sida aggregata* (número de acceso MF632078, MH090690), *S. collina* (número de acceso MF632079, MH090691), *S. haenkeana* (número de acceso MF632080, MH090692), *Sida acuta* (número de acceso MF632081, MH090693) y *Malachra fasciata* (número de acceso MF632082, MH090694) con iniciadores universales para begomovirus y específicos para OYMMV. El OYMMV se detectó por PCR con los iniciadores OYMMV-3-F/OYMMV-3-R en plántulas de las cinco especies de malezas en diferentes tasas relativas (plántulas positivas/plántulas analizadas; número de acceso): *Sida aggregata* (3/10; MH090695) *S. collina* (2/10; MH090696), *S. haenkeana* (1/10; MH090697), *Sida acuta* (5/10; MH090698) y *Malachra fasciata* (1/10; MH090699) y no se observaron síntomas en ellas. De manera similar, las plántulas asintomáticas de *Ipomoea batatas* y *Vigna mungo* fueron positivas para *Sweet potato leaf curl virus* y *Mung bean yellow mosaic virus*, respectivamente (Kim *et al.*, 2015; Kothandaraman *et al.*, 2016). La detección de OYMMV en semillas y plántulas de

(3/10; MH090695), *S. collina* (2/10; MH090696), *S. haenkeana* (1/10; MH090697), *Sida acuta* (5/10; MH090698) and *Malachra fasciata* (1/10; MH090699) and no symptoms were observed in them. Similarly, asymptomatic seedlings of *Ipomoea batatas* and *Vigna mungo* were positive for *Sweet potato leaf curl virus* and *Mung bean yellow mosaic virus*, respectively (Kim *et al.*, 2015; Kothandaraman *et al.*, 2016). Detection of OYMMV in seed and seedlings of five weed species suggests that this virus is inside the seed and it can be transmitted from one generation to another through the embryo (Kim *et al.*, 2015). It is known that many viruses that are transmitted by seed do so only in certain plant species and not others, such as the TYLCV that is transmitted by seed of *Solanum lycopersicum* (Kil *et al.*, 2016) but not of *Nicotiana benthamiana* (Rosas-Díaz *et al.*, 2017). The latter could explain the detection of OYMMV in weed seeds but not in roselle. WfaBV3 was detected in roselle plants exhibiting mosaics, whereas OYMMV was associated to plants showing yellow mosaics. Five species of *Malvaceae* considered as weeds were identified to harbor OYMMV and it was transmitted by seed in all them. WfaBV3 was not detected in weeds and there was no transmission of this virus or OYMMV to roselle seeds nor seedlings. To our knowledge, this is the first report of four new weed hosts of OYMMV and its transmission by seed.

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

cinco especies de malezas sugiere que este virus está dentro de la semilla y puede transmitirse de una generación a otra a través del embrión (Kim *et al.*, 2015). Se sabe que muchos virus transmitidos por semilla lo hacen solo en ciertas especies de plantas y no en otras, como el TYLCV que se transmite por

semilla de *Solanum lycopersicum* (Kil *et al.*, 2016) pero no de *Nicotiana benthamiana* (Rosas- Díaz *et al.*, 2017). Lo anterior podría explicar la detección de OYMMV en semillas de malezas pero no en semillas de jamaica.

WfaBV3 se detectó en plantas de jamaica con mosaico, mientras que OYMMV se asoció con plantas que mostraban mosaicos amarillos. Se identificaron cinco especies de *Malvaceae* consideradas como malezas infectadas por OYMMV y éste se transmitió por semilla en todas ellas. WfaBV3 no se detectó en malezas y no hubo transmisión de este virus ni del OYMMV en semilla ni plántulas de jamaica. Este es el primer reporte de cuatro nuevas malezas hospedantes de OYMMV y de su transmisión por semilla.

## LITERATURA CITADA

- Albrechtsen SE. 2006. Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols. London, UK. CAB International. DOI:10.1079/9780851990163.0000.
- Brown JK, Zerbini FM, Navas-Castillo J, Moriones E, Ramos-Sobrinho R, Silva JCF, Fiallo-Olivé E, Briddon RW, Hernández-Zepeda C, Idris A, Malathi VG, Martin DP, Rivera-Bustamante R, Ueda S and Varsani A. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology* 160 (6):1593-1619. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-y>.
- Brown JK, Idris AM, Torres-Jerez I, Banks GK and Wyatt SD. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of Virology* 146:1581-98. <https://doi.org/10.1007/s007050170080>.
- Chatterjee A and Ghosh SK. 2008. Alterations in biochemical components in mesta plants infected with yellow vein mosaic disease. *Brazilian journal of plant physiology* 20(4):267-275. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202008000400002>.
- Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21. <https://doi.org/10.1007/BF027126>.
- Dikova B. 2005. Tobacco rattle virus (TRV) transmission by sugar beet seeds. *Biotechnology & Biotechnological equipment* 19(2):87-90. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817196>.
- Dikova B. 2005. Tobacco rattle virus (TRV) transmission by sugar beet seeds. *Biotechnology & Biotechnological equipment* 19(2):87-90. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817196>.
- Gambino G and Gribova I. 2006. Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Coamplification of a Plant RNA as Internal Control. *Phytopathology* 96(11):1223-1229. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1223>.
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela OA. 2007. Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Virus Genes* 35(3):825-833. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0149-1>.
- Kai-Shu L, Harrison HF, Simmons AM, Zhang SC and Jackson DM. 2011. Experimental host range and natural reservoir of *Sweet potato leaf curl virus* in the United States. *Crop Protection* 30:1055-1062. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.009>.
- Kil E.-J, Kim S, Lee Y.-J, Byun H.-S, Park J, Seo H, Kim C.-S, Shim J.-K, Lee J.-H, Kim, J.-K, Lee K.-Y, Choi H.-S and Lee S. 2016. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Reports* 6:19013. <http://dx.doi.org/10.1038/srep19013>.
- Kim J, Kil E.-J, Kim S, Seo H, Byun H.-S, Park J, Chung M.-N, Kwak H.-R, Kim M.-K, Kim C.-S, Yang J.-W, Lee K.-Y, Choi H.-S and Lee S. 2015. Seed transmission of *Sweet potato leaf curl virus* in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Pathology* 64:1284-1291. <https://doi.org/10.1111/ppa.12366>.
- Kothandaraman SV, Devadason A. and Ganesan MV 2016. Seed-borne nature of a begomovirus, *Mung bean yellow mosaic virus* in black gram. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 1925–1933. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7188-7>.
- Muhammad A, Wenzhong L, Lihuang L, Waqar I, Zhang J, Zifu H, Zhenguo D and Zujian W. 2017. *Cotton leaf curl Multan virus* infecting *Hibiscus sabdariffa* in China. *Canadian Journal of Plant Pathology* 40 (1):128-131, DOI: 10.1080/07060661.2017.1389770.
- Nascimento LD, Silva SJC, Sobrinho RR, Ferro MMM, Oliveira MHC, Zerbini FM, Assunção IP and Lima GSA. 2016. Complete nucleotide sequence of a new begomovirus infecting a malvaceous weed in Brazil. *Archives of Virology* 161:1735-1738. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2822-y>.
- Prajapat R, Marwal A and Gaur RK. 2014. Begomovirus associated with alternative host weeds: a critical appraisal Begomovirus associated with alternative host weeds: *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47:157-170. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.805497>.
- Rosario K, Seah Y, Marr C, Varsani A, Kraberger S, Stainton D, Moriones E, Polston J, Duffy S, and Breitbart M. 2015. Vector-Enabled Metagenomic (VEM) Surveys Using Whiteflies (Aleyrodidae) Reveal Novel Begomovirus Species in the New and Old Worlds. *Viruses* 7:5553-5570. <https://doi.org/10.3390/v7102895>.
- Rosas-Díaz T, Zhang D and Lozano-Durán R. 2017. No evidence of seed transmissibility of *Tomato yellow leaf curl virus* in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 18:437-440. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600463>.
- Sharman M, Persley DM and Thomas JE. 2009. Distribution in Australia and seed transmission of *Tobacco streak virus*

- in *Parthenium hysterophorus*. Plant Disease 93:708-712.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-93-7-0708>
- Velázquez-Fernández P, Zamora-Macorra EJ, Ochoa-Martínez DL, Negrete-Fernández G y Hernández-Morales J. 2016. Virus asociados al amarillamiento de *Hibiscus sabdariffa* en Guerrero, México. Revista Mexicana de Fitopatología 34:200–207. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1602-1>.
- Wyatt SD and Brown JK. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology 86:1288-1293. Disponible en línea: [http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n12\\_1288.PDF](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n12_1288.PDF).