

Virus associated to yellowing of *Hibiscus sabdariffa* in Guerrero, Mexico

Virus asociados al amarillamiento de *Hibiscus sabdariffa* en Guerrero, México

Patricia Velázquez-Fernández, Erika Janet Zamora-Macorra, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez*, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México- Texcoco. Montecillo, Estado de México, CP 56230; Grisel Negrete-Fernández, Dirección General de Sanidad Vegetal, Departamento de Fitopatología, km 37.5 Carr. México-Pachuca, Tecámac, Estado de México, CP 51379; Javier Hernández-Morales. Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México- Texcoco. Montecillo, Estado de México, CP 56230. *Autor de Correspondencia: ldaniel@colpos.mx.

Recibido: 3 de febrero de 2016

Aceptado: 15 de abril de 2016

Velázquez-Fernández P, Zamora-Macorra EJ, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J. 2016. Virus asociados al amarillamiento de *Hibiscus sabdariffa* en Guerrero, México. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 200-207.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1602-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1602-1)

Primera publicación DOI: 15 de abril 2016.

First DOI published: April 15th, 2016.

Resumen. En la zona productora de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) del estado de Guerrero en el ciclo otoño-invierno 2014 se observaron cinco parcelas con una incidencia de 90 a 100 % de plantas con aclaramiento de nervaduras, mosaico y amarillamiento. Se colectaron plantas asintomáticas y con los síntomas antes descritos y se injertaron en plantas sanas de jamaica observándose clorosis de venas y mosaico 17 días después en las plantas injertadas con hojas que mostraban síntomas. Se extrajo DNA y RNA de tejido de las plantas colectadas en campo y de las injertadas que mostraron síntomas y se analizó para fitoplasmas,

Abstract. In the producing area of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in the state of Guerrero, five plots with an incidence of 90-100 % of plants showing vein chlorosis, mosaic and yellowing were observed in the autumn-winter 2014 crop cycle. Asymptomatic and symptomatic plants were collected and grafted onto healthy plants and at 17 days after inoculation vein chlorosis and mosaic were observed in plants grafted with leaves showing symptoms. DNA and RNA were extracted from plants collected in the field and those grafted that showed symptoms and analyzed for phytoplasmas, begomoviruses, viruses of the family *Potyviridae* and *Okra mosaic virus* (OkMV). No amplification were obtained for phytoplasmas, viruses of the family *Potyviridae* and *Okra mosaic virus* in plants collected in the field and grafted that showed symptoms; only they were positive for begomoviruses. Sequences from eighth plants with symptoms collected at field and one grafted showing symptoms had a similarity of 95 % and 91 %, respectively, with *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV). Two plants with symptoms

begomovirus, virus de la familia *Potyviridae* y *Okra mosaic virus* (OkMV). Los resultados para fitoplasmas, virus de la familia *Potyviridae* y *Okra mosaic virus* fueron negativos. Sólo se tuvo el amplicón esperado en el caso de begomovirus. Las secuencias de ocho plantas con síntomas colectadas en campo tuvieron una similitud del 95 % con *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV). Dos plantas con síntomas colectadas en campo mostraron un porcentaje de similitud menor a otros begomovirus. Los resultados obtenidos indican que el amarillamiento de la jamaica está asociado a un complejo de begomovirus en el que se encuentra presente el OkYMMV.

Palabras clave: jamaica, begomovirus, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, amplificación por círculo rodante.

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es un arbusto cuyos cálices deshidratados y tallos se utilizan para elaborar productos alimenticios, farmacéuticos, cosméticos y textiles. Los principales países productores de esta planta son China, India y Sudán (Galicía-Flores *et al.*, 2008). México ocupa el séptimo lugar, siendo el estado de Guerrero el mayor productor, con una superficie sembrada de 14 274 ha (SIAP, 2014). El principal problema fitosanitario de este cultivo en México es la “pierna negra” causada por *Phytophthora parasitica* y actualmente la mancha foliar y de cálices ocasionada por *Corynespora cassiicola* (Ortega *et al.*, 2015). A nivel mundial existen cuatro virus afectando jamaica: *Cotton leafcurl virus* (CLCuV), *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV), *Malva vein clearing virus* (MVCV) y *Okra mosaic virus* (OkMV) (Fauquet *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2009). Durante los últimos años en algunos municipios del estado de Guerrero

collected at field showed a lower similarity with different begomoviruses. These results indicate that yellowing of *Hibiscus sabdariffa* is associated with a viral complex in which OkYMMV is present.

Additional keywords: roselle, begomoviruses, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, rolling-circle amplification.

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) is a shrub with calyces that, when dehydrated, are used to produce foods, medications, cosmetics, and textiles. The main producers of this plant are China, India, and Sudan (Galicía-Flores *et al.*, 2008). Mexico is seventh place, and the state of Guerrero is the main producer nationwide, with a planted surface of 14 274 ha (SIAP, 2014). The main phytosanitary problem of this crop in Mexico is “black shank,” caused by *Phytophthora parasitica*, and currently, spots on leaves and calyces caused by *Corynespora cassiicola* (Ortega *et al.*, 2015). Worldwide there are four viruses that affect roselle: *Cotton leafcurl virus* (CLCuV), *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV), *Malva vein clearing virus* (MVCV), and *Okra mosaic virus* (OkMV) (Fauquet *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2009). In recent years in some municipalities of the state of Guerrero, a disease has been found in roselle of an unknown etiology, known locally as “yellowing.” The plants affected show symptoms consisting of vein clearing mosaic, and yellowing, and its incidence had been very low. However, it has been increasing considerably, and in the 2014 autumn-winter cycle it reached values of 90 to 100 % on five plots, therefore the aim of this study was to know the agent related to this disease. Ten 2-month old roselle plants were sampled, showing vein clearing, mosaic, and yellowing, as well as three asymptomatic plants in a field in the municipality of Tecoaapa

se ha detectado una enfermedad en jamaica de etiología desconocida, denominada localmente como “amarillamiento”. Las plantas afectadas presentan síntomas consistentes en aclaramiento de nervaduras, mosaico y amarillamiento y su incidencia había sido muy baja. No obstante, se ha venido incrementando de manera considerable y en el ciclo otoño-invierno 2014 alcanzó valores de 90 a 100 % en cinco parcelas por lo que el objetivo del presente estudio fue conocer al agente asociado a esta enfermedad. Se colectaron 10 plantas de jamaica de dos meses de edad que presentaban aclaramiento de nervaduras, mosaico y amarillamiento, así como tres plantas asintomáticas en una parcela del municipio de Tecoaapa y cuatro parcelas del municipio de Ayutla, Guerrero (Figura 1A). Se inocularon mecánicamente cinco plantas de jamaica sanas obtenidas de semilla utilizando como fuente de inóculo hojas de jamaica con síntomas colectadas en campo maceradas en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 y carborundum 400 mallas (Dijkstra y de Jager, 1998). Como testigo se tuvieron tres plantas de jamaica sanas frotadas solamente con la solución amortiguadora y el carborundum. Hojas de plantas con síntomas colectadas en campo se injertaron en cinco plantas de jamaica sanas de dos meses de edad, obtenidas a partir de semilla, y se mantuvieron en invernadero para registrar la aparición de síntomas cada dos días durante un mes. Como testigo se tuvo una planta sana de jamaica obtenida a partir de semilla sin injertar. Se extrajeron ácidos nucleicos totales de hojas de las plantas de jamaica asintomáticas y con síntomas colectadas en campo y se analizaron para fitoplasmas (Teixeira *et al.*, 2008), virus de la familia *Potyviridae* (Chen *et al.*, 2001), *Okra mosaic virus* (OkMV) (Stephan *et al.*, 2008) y begomovirus. En este último caso se utilizó el kit TempliPhi 100 Amplification[®] (Amersham Biosciences) que amplifica DNA circular por

and four fields in the municipality of Ayutla, Guerrero (Figure 1A). Five healthy roselle plants obtained from seed were mechanically inoculated, using roselle leaves with symptoms, as inoculum sampled on the field, grinding in a phosphate buffer solution pH 7.2 and carborundum 400 mesh (Dijkstra and de Jager, 1998). As a control, there were three healthy roselle plants rubbed only with the buffer solution and the carborundum. Leaves from plants with symptoms collected in the field were grafted onto five healthy two-month old roselle plants obtained from seed, and they were kept in a greenhouse to observe the appearance of symptoms every two days for one month. As a control, there was a healthy roselle plant obtained from seeds without grafting. Total nucleic acids were extracted from the leaves from asymptomatic and symptomatic roselle plants collected from the field, and they were analyzed for phytoplasmas (Teixeira *et al.*, 2008), *Potyviridae* family viruses (Chen *et al.*, 2001), *Okra mosaic virus* (OkMV) (Stephan *et al.*, 2008), and begomoviruses. For the latter, we used the TempliPhi 100 Amplification[®] kit (Amersham Biosciences) that amplifies DNA via rolling circle (RCA) following the manufacturer's instructions. For the DNA-A of the begomoviruses, we designed the primers *Sense* DNA-AC (AAACTCGAGGATGTGAAGGCCCATG) and *Antisense* DNA-AC (AAAAGGGAAGACGATGTGGGC), which amplify a fragment of approximately 1400 pb corresponding to genes AV1, AC3, AC2, and AC1. For DNA-B, we used the primers proposed by Rojas *et al.*, (1993), which amplify a fragment of 500 pb. The reaction mixture consisted of 1 µL of DNA obtained by RCA, PCR reaction buffer (1X), 0.20 mM dNTPs, 2.0 mM MgCl₂, 10 µM of each primer, 0.5 U of Taq polymerase (PROMEGA[®]), adjusting to a final volume of 20 µL. The PCR was carried out with the following conditions: initial denaturation

círculo rodante (ACR) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el DNA-A de los begomovirus se diseñaron los iniciadores *Sense* DNA-AC (AAACTCGAGGATGTGAAGGCCCATG) y *Antisense* DNA-AC (AAAAGGGAAGACGATGTGGGC) que amplifican un fragmento de aproximadamente 1400 pb correspondiente a los genes AV1, AC3, AC2 y AC1. Para el DNA-B se utilizaron los iniciadores propuestos por Rojas *et al.*, (1993) que amplifican un fragmento de 500 pb. La mezcla de reacción consistió en 1 μ L de DNA obtenido por ACR, buffer de reacción de PCR (1X), 0.20 mM dNTPs, 2.0 mM MgCl₂, 10 μ M de cada iniciador, 0.5 U de Taq polimerasa (PROMEGA®) ajustando a un volumen final de 20 μ L. La PCR se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 94 °C por 4 min, 30 ciclos desnaturalización de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1.5 min, un ciclo de extensión final de 72 °C por 3 min. Los productos amplificados de 1400 pb fueron secuenciados y comparados con la base de datos del GenBank.

Después de 30 días, las plantas inoculadas mecánicamente no mostraron síntomas, lo cual pudo deberse a una baja concentración de virus así como la presencia de inhibidores, taninos por ejemplo, en el material vegetal utilizado como fuente de inóculo que afectan la proteína de la cápside provocando la precipitación de los virus (Dijkstra y de Jager, 1998), o bien, de un virus no transmisible de esta forma. De La Torre-Almaraz *et al.*, (2004) señalan que muchos virus con genoma RNA se transmiten fácilmente de forma mecánica y que la mayoría de los virus con genoma DNA no se transmiten de esta manera o su eficiencia de transmisión es muy baja. Cuatro de las plantas injertadas mostraron clorosis de venas y mosaico en las hojas más jóvenes a los 17 días después de realizado el injerto (Figura 1B). Los síntomas observados en invernadero fueron distintos de los

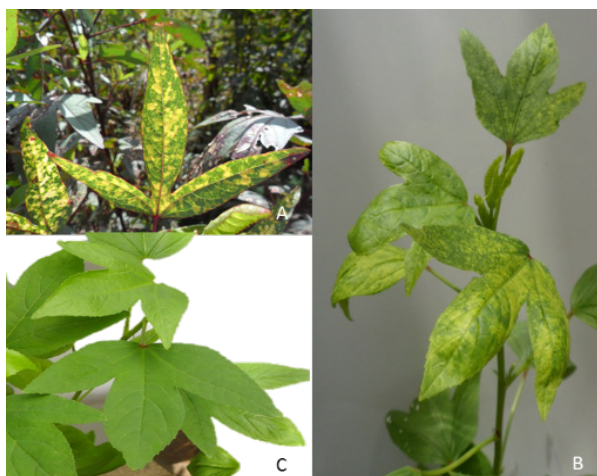


Figura 1. Plantas de jamaica mostrando A. Mosaico amarillo (planta colectada en Tecoanapa, Guerrero). B. Mosaico (planta injertada en invernadero con hojas de plantas colectadas en campo). C. Testigo: planta sana obtenida a partir de semilla sin injertar.

Figure 1. Roselle plants showing A. Yellow mosaic (plant sampled from Tecoanapa, Guerrero). B. Mosaic (plant grafted in greenhouse with leaves collected from field). C. Control: Healthy plant obtained from ungrafted seed.

94 °C for 4 min, 30 denaturation cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1.5 min, one final extension cycle of 72 °C for 3 min. The amplified products of 1400 pb were sequenced and compared with the GenBank data base.

After 30 days, the mechanically inoculated plants showed no symptoms, possibly due to a low concentration of the virus, as well as the presence of inhibitors such as tannins in the plant material used as a source of inoculum that affect the protein of the capsid, causing the precipitation of the virus (Dijkstra and de Jager, 1998), or of a non-transmissible virus in this way. De La Torre-Almaraz *et al.*, (2004) point out that many viruses with an RNA genome are easily transmitted mechanically, and most viruses with a DNA genome are not transmitted in this way, or their transmission efficiency is very low. Four of the

registrados en campo debido posiblemente a las diferentes condiciones ambientales, edad en que se inocularon las plantas (se desconoce el momento de infección en campo), la forma de inoculación (no se sabe si en campo ocurre por vectores o semilla por ejemplo), la carga de inóculo o la presencia de otro(s) virus en campo. Tejido foliar de las cuatro plantas de jamaica injertadas que presentaron síntomas fue usado para hacer extracción de DNA total, amplificación por círculo rodante y PCR para begomovirus de la manera antes descrita.

No se tuvo la amplificación del producto esperado para fitoplasmas, virus de la familia *Potyviridae* y *Okra mosaic virus* (OkMV). Las diez plantas de jamaica con síntomas colectadas en campo y cuatro injertadas que mostraron síntomas en invernadero amplificaron el fragmento del componente A del genoma de begomovirus (1400

grafted plants displayed vein chlorosis and mosaic in younger leaves 17 days after grafting (Figure 1B). The symptoms observed in the greenhouse were different to those recorded on the field, due possibly to the different environmental conditions, age in which plants were inoculated (the moment of infection on the field is unknown), the means of inoculation (whether it occurs on the field by vectors or seed, for example, is unknown), the amount of inoculum, or the presence of other viruses in the field. Foliar tissue of the four grafted roselle plants that showed symptoms were used to carry out a total DNA extraction, rolling circle amplification and PCR for begomoviruses as described above.

The expected product amplification was not obtained for phytoplasmas, viruses of the family *Potyviridae* and *Okra mosaic virus* (OkMV). The ten roselle plants with symptoms obtained

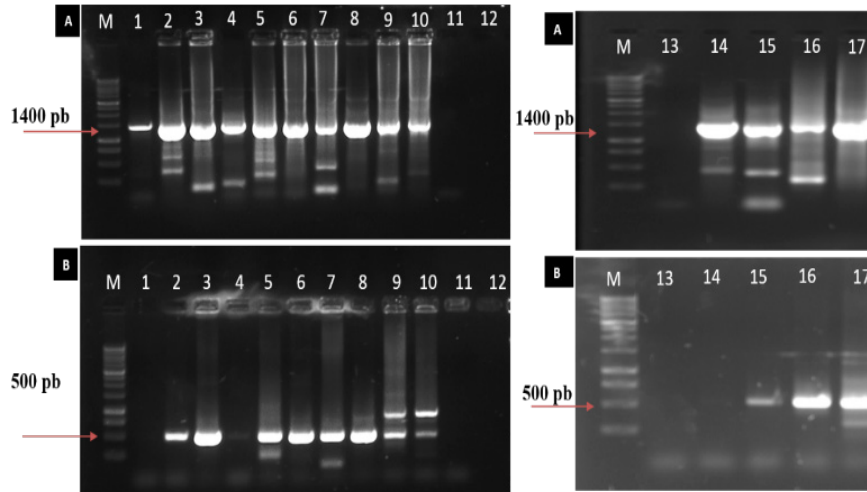


Figura 2. Productos de PCR obtenidos con **A.** iniciadores *Sense* DNA-AC/*Antisense* DNA-AC (1400 pb) para el segmento A y **B.** PBL1v2040/PCRC1 (500 pb) para el segmento B de begomovirus bipartitas, respectivamente, a partir de DNA circular amplificado por círculo rodante. Carriles 1-7, 14-16: Plantas de jamaica con síntomas colectadas en campo; Carriles 8-10 y 17. Plantas injertadas que mostraron mosaico; Carril 11: Testigo negativo (planta asintomática); Carriles 12 y 13: Testigo negativo (agua); M: Marcador de peso molecular 1Kb (Promega®).

Figure 2. PCR products obtained with **A.** primers *Sense* DNA-AC/*Antisense* DNA-AC (1400 pb) for the segment A and **B.** PBL1v2040/PCRC1 (500 pb) for the segment B of bipartite begomovirus, respectively, from DNA obtained by circle amplification. Lanes 1-7, 14-16: Roselle plants with symptoms, collected from field; Lanes 8-10 and 17. Grafted plants that showed mosaic; Lane 11: Negative control (asymptomatic plant); Lanes 12 and 13: Negative control (water); M: Molecular weight marker 1Kb (Promega®).

pb) (Figura 2A). Siete plantas colectadas en campo y cuatro plantas injertadas que mostraron síntomas amplificaron el fragmento del componente B del genoma de begomovirus (500 pb) (Figura 2B). Estos resultados indican que la mayoría de las plantas muestreadas en Ayutla y Tecoaapa están infectadas con begomovirus bipartitas y que hay al menos uno monopartita. De las diez plantas con síntomas colectadas en campo, ocho tuvieron un porcentaje de similitud de 95 % con *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV), una tuvo un 91 % de similitud con el *Chino del tomate virus* (CdTV) y la restante tuvo un 88% de similitud con el *Malachra alceifolia virus* (MAV). Por otro lado, una de las plantas injertadas con síntomas tuvo un 91 % de identidad con el OkYMMV y las tres restantes un 86-87 % de similaridad con el *Tobacco leaf curl Cuba virus* (TbLCCV). Los bajos porcentajes de similaridad obtenidos en el caso del CdTV, MAV y TbLCCV posiblemente se deban a que se trata de begomovirus no descritos hasta el momento. En México se ha reportado al *Hibiscus variegado virus* (HVV) en *Hibiscus sabdariffa* en la península de Yucatán (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007), mientras que en la India, Roy *et al.*, (2009) encontraron al begomovirus *Mesta yellow vein mosaic virus* (MYVMV) en *Hibiscus cannabinus* e *H. sabdariffa*, causando reducción del crecimiento y pérdidas en la producción. Inicialmente el MYVMV ocasiona una clorosis en las nervaduras seguido de un amarillamiento de la lámina foliar. Estos síntomas difieren de los observados en plantas de jamaica colectadas en Guerrero, en las cuales inicialmente se observa un aclaramiento de nervaduras seguido de un mosaico que con el tiempo desaparece y la hoja se torna amarilla con algunas áreas color verde oscuro o blanco. En la península de Yucatán se ha reportado al OkYMMV ocasionando mosaico amarillo y distorsión foliar en *Abutilon permolle*; mosaico

on the field and four grafted plants that displayed symptoms in the greenhouse amplified the fragment of component A of the begomovirus genome (1400 pb) (Figure 2A). Seven plants collected in the field, and four grafted plants that showed symptoms amplified the fragment of the component B of the begomovirus genome (500 pb) (Figure 2B). These results indicate that most of the plants sampled in Ayutla and Tecoaapa are infected with bipartite begomoviruses and that there is at least one monopartite. Out of the ten plants sampled in the field, eight had a percentage of similarity of 95 % with *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV), one had a similarity of 91% with the *Chino del tomate virus* (CdTV), and the rest had a similarity of 88 % with the *Malachra alceifolia virus* (MAV). On the other hand, one of the grafted plants with symptoms had a similarity of 91 % with OkYMMV, and the three remaining, a similarity of 86-87 % with *Tobacco leaf curl Cuba virus* (TbLCCV). The low percentages of similarity obtained in the case of the CdTV, MAV, and TbLCCV are possibly due to yet undescribed begomoviruses. In Mexico there have been reports of the *Hibiscus variegado virus* (HVV) in *Hibiscus sabdariffa* in the Yucatan Peninsula (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007), while in India Roy *et al.* (2009) found the begomoviruses *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV) in *Hibiscus cannabinus* e *H. sabdariffa*, causing a reduction in growth and losses in production. Initially, MeYVMV causes chlorosis in nervations, followed by the yellowing of leaves. These symptoms differ from those observed in roselle plants sampled in Guerrero, in which a clearing of nervations is initially observed, followed by a mosaic that disappears with time, and the leaf turns yellow with some dark green or white areas. There have been reports in the Yucatan Peninsula of OkYMMV causing yellow mosaic and foliar distortion in *Abutilon permolle*;

amarillo, distorsión y moteado foliar en *Corchorus siliquosus*; y mosaico amarillo y moteado en *Sida acuta* (Hernández-Zepeda, *et al* 2007). En 2009, el OkYMMV fue reportado en Texas en el cultivo de oca (*Abelmoschus esculentus*) causando manchas foliares irregulares de color amarillo, amarillamiento de los bordes de las hojas y clorosis en hojas maduras (Hernández-Zepeda *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el amarillamiento de la jamaica en Guerrero, México, está asociado con begomovirus entre los cuales se encuentra el *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV).

AGRADECIMIENTOS

Al Fideicomiso Revocable de Administración 2013 No. 167304 del Colegio de Postgraduados por el apoyo económico proporcionado para realizar parte de esta investigación. 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. Financiado por el FONDO SECTORIAL SAGARPA-CONACYT por financiar parcialmente el presente estudio.

yellow mosaic, foliar distortion and spotting in *Corchorus siliquosus*; and yellow mosaic and mottling in *Sida acuta* (Hernández-Zepeda, *et al* 2007). In 2009, OkYMMV was reported in Texas in okra (*Abelmoschus esculentus*) crops causing irregular, yellow-colored foliar spots, yellowing of the edges of leaves, and chlorosis in mature leaves (Hernández-Zepeda *et al.*, 2010). The results obtained in this study indicate that the yellowing of roselle in Guerrero, Mexico, is associated to begomoviruses, including *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV).

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Fideicomiso Revocable de Administración 2013 No. 167304 of the Colegio de Postgraduados for the monetary support provided to carry out part of this investigation. To the project "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" Project code: 163972. Financed by the FONDO SECTORIAL SAGARPA-CONACYT for partially funding this study.

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

## LITERATURA CITADA

- Chen J, Chen J and Adams M. 2001. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology* 146:757-766. <https://www.doi.org/10.1007/s007050170144>
- De La Torre-Almaráz R, Monsalvo-Reyes AC, Méndez-Lozano J and Rivera-Bustamante RF. 2004. Caracterización de un nuevo geminivirus asociado con los síntomas de moteado amarillo de la Okra (*Abelmoschus esculentus*) en México. *Agrociencia* 38: 227-238. <http://www.colpos.mx/agrociencia/Bimestral/2004/mar-abr/art-10.pdf>
- Dijkstra J and de Jager PC. 1998. *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises*, Springer-Verlag, Berlin. 461 p. <http://www.springer.com/us/book/9783642720307>
- Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U and Ball L A. 2005. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier, Academic Press, San Diego, California. 1259 p.
- Galicia-Flores LA, Salinas-Moreno Y, Espinoza-García BM and Sánchez-Feria C. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14 (2): 121-129. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rchsh/v14n2/v14n2a4.pdf>
- 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* 35:825-833. <http://www.doi.org/10.1007/s11262-007-0149-1>
- Hernández-Zepeda C, Isakeit T, Scott A Jr. and Brown JK. 2010. First Report of Okra yellow mosaic Mexico virus in

- Okra in the United States. *Plant Disease* 94 (7): 924. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-7-0924B>
- Ortega A A S, Hernández M J, Ochoa M D L and Ayala E V. 2015. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and calyx spot on roselle in Mexico. *Plant Disease* 99(7):1041. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0438-PDN>
- Roy A, Acharyya S, Das S, Ghosh R, Paul S, Srivastava RK and Ghosh SK. 2009. Distribution, epidemiology and molecular variability of the begomovirus complexes associated with yellow vein mosaic disease of mesta in India. *Virus Research* 141:237–246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2008.11.022>
- Rojas MR, Gilberston RL, Russell DR and Maxwell DP. 1993. Use of degenerate primers in the polimerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-77-0340>
- SIAP, 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- Stephan D, Siddiqua M, Ta Hoang A, Engelmann J, Winter S and Maiss E. 2008. Complete nucleotide sequence and experimental host range of *Okra mosaic virus*. *Virus Genes* 36:231-240. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-007-0181-1>
- Teixeira DC, Wuff NA, Martins EC, Kitajima EW, Bassanezi R, Ayres AJ, Eveillard S, Sallard C and Bové JM. 2008. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches' broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98: 977-984. <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO-98-9-0977>