

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

VARIABILIDAD BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Iris yellow spot virus* EN CULTIVOS DE CEBOLLA DEL ESTADO DE MORELOS

KATYA ORNELAS OCAMPO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS


MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

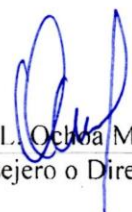
2017

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS
REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe Katya Ornelas Ocampo, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional o internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Daniel L. Ochoa Martínez, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "Variabilidad biológica y molecular de aislamientos de *Iris yellow spot virus* en cultivos de cebolla del estado de Morelos" y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. De Texcoco, Edo. de México, a 18 de julio de 2017.


Firma del
Alumno (a)


Dr. Daniel L. Ochoa Martínez
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis, titulada: "Variabilidad biológica y molecular de aislamientos de *Iris yellow spot virus* en cultivos de cebolla del estado de Morelos", realizada por la alumna: Katya Ornelas Ocampo, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Daniel E. Ochoa Martínez

ASESOR



Dr. Sergio Aranda Ocampo

ASESOR



Dr. Sergio Ramírez Rojas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio 2017

VARIABILIDAD BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Iris yellow spot virus* EN CULTIVOS DE CEBOLLA DEL ESTADO DE MORELOS

Katya Ornelas Ocampo, MC.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

En plantas de cebolla cultivadas en el estado de Morelos se observaron dos síntomas asociados a *Iris yellow spot virus* (IYSV) cuyos aislamientos fueron denominados como típicos o severos. La presente investigación tuvo como objetivo caracterizar biológica y molecularmente ambos aislamientos. Cuatro aislamientos típicos y cinco severos se evaluaron por inoculación mecánica en *Nicotiana benthamiana* y mantenidos post-inoculación en cámara bioclimática o invernadero. En las dos condiciones ambientales ambos aislamientos desarrollaron infección sistémica con menor severidad en invernadero que en cámara bioclimática. En esta última los aislamientos severos causaron necrosis en venas, constricción de peciolo, lesiones necróticas foliares rodeadas por un halo café oscuro, clorosis y marchitamiento; en contraste, los aislamientos típicos causaron clorosis, enroscamiento de hojas y marchitamiento. Se diseñaron los primers IYSV-KO4 e IYSV-KO6 para la amplificación del gen N. La secuencia de nucleótidos tuvo 99% de identidad con la nucleoproteína de IYSV sin que se observaran cambios entre aislamientos. Los aislamientos fueron clasificados con el genotipo IYSV_{BR} y en el análisis filogenético tuvieron mayor similitud con los reportados en Canadá y Estados Unidos.

Palabras clave: *Tospovirus*, *Bunyaviridae*, *Allium cepa*.

BIOLOGICAL AND MOLECULAR VARIABILITY OF *Iris yellow spot virus* ISOLATES IN ONION CROPS FROM MORELOS STATE

Katya Ornelas Ocampo, MC

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

In onion plants cultivated in Morelos State, two symptoms associated with *Iris yellow spot virus* (IYSV) were observed, whose isolates were denominated as typical or severe. The aim of this research was to characterize—biologically and molecularly—both isolates. Four typical and five severe isolates were evaluated by mechanical inoculation in *Nicotiana benthamiana* and maintained after inoculation in a climatic chamber or greenhouse. Both isolates developed systemic infection in the two environmental conditions with less severity in greenhouse than the climatic chamber. In this last, severe isolates caused veinal necrosis, petioles constriction, foliar necrotic lesions surrounded by dark brown halo, chlorosis and wilting. In contrast, typical isolates caused chlorosis, leaf twisting and wilting. IYSV-KO4 and IYSV-KO6 primers were designed for amplification of the N gene. The nucleotide sequence had an identity of 99% with the IYSV nucleoprotein, without any changes between isolates. The isolates were classified with the IYSV_{BR} genotype and the phylogenetic analyses were more similar to those reported in Canada and the United States.

Key words: *Tospoviruses, Bunyaviridae, Allium cepa.*

Para Gali, con todo mi amor por siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, al programa de Fitosanidad-Fitopatología y a todo el personal que lo integra por los conocimientos compartidos.

A mi consejo particular Dr. Daniel L. Ochoa Martínez, Dr. Sergio Aranda Ocampo y Dr. Sergio Ramírez Rojas por sus sugerencias, orientación y apoyo tanto profesional como moral.

Al Dr. Daniel Ochoa por la confianza, asesoramiento y apoyo invaluable para terminar este proyecto.

Al Dr. Hernán García Ruíz por su colaboración y sugerencias que ayudaron a enriquecer la presente investigación.

A mis compañeros y compañeras de posgrado por compartir conocimientos y experiencias. A mis amigas del Laboratorio de Virus Fitopatógenos Norma, Noemí, Erika, Tania y Paty, por enseñarme en lo profesional y personal.

A Norma, Noemí, Edith, Adriana y Claudia, por la motivación y el cariño que me dieron siempre.

Agradezco a toda mi familia por apoyarme e impulsarme en cada etapa de mi vida. Especialmente a mi mamá Soco y a mis hermanas Ana y Sara por darme fuerza y amor. A mi papá Fidel por seguir iluminando con su ejemplo mis días.

Con especial agradecimiento a mi esposo, Galileo Gallardo, por apoyarme, luchar conmigo y darme todo lo que necesité para estudiar el posgrado. Su amor, esfuerzo, valentía y perseverancia son mi inspiración más grande.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Cultivo de cebolla	1
1.2 <i>Iris yellow spot virus</i> (IYSV)	2
1.3 <i>Thrips tabaci</i>	6
1.4 Variabilidad biológica y molecular de IYSV	8
1.5 IYSV en Morelos	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo general	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Colecta de muestras	11
3.2 Inoculación mecánica	12
3.3 Extracción de ARN total	12
3.4 Retrotranscripción	13
3.5 PCR	13
3.6 Diseño de primers específicos para el segmento S de IYSV	14
3.7 Análisis de secuencias	16
3.8 Caracterización genotípica	16
4. RESULTADOS	17
4.1 Colecta de muestras	17
4.2 Inoculación mecánica	18
4.3 Extracción de ARN total	21
4.4 PCR	23

4.5	Diseño de primers específicos para el segmento S de IYSV	25
4.6	Análisis de secuencias	27
4.7	Caracterización genotípica	28
5.	DISCUSIÓN	30
6.	CONCLUSIÓN	35
7.	LITERATURA CITADA	36

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Programa de PCR para detección de IYSV.....	14
Cuadro 2.	Programa de PCR para amplificación del gen 18S ARNr.....	15
Cuadro 3.	Síntomas observados en plantas de <i>N. benthamiana</i> inoculadas mecánicamente con aislamientos típicos o severos de <i>Iris yellow spot virus</i> en dos condiciones post-inoculación	20
Cuadro 4.	Primers diseñados para la amplificación del segmento S de <i>Iris yellow spot virus</i>	26
Cuadro 5.	Programa de PCR para amplificación del gen N de IYSV con los primers IYSV-KO4 e IYSV-KO6.....	26
Cuadro 6.	Número de acceso en GenBank de secuencias del gen N procedentes de aislamientos típicos o severos de <i>Iris yellow spot virus</i>	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Virión de las especies de la familia <i>Bunyaviridae</i> . Genoma del género <i>Tospovirus</i> y estrategia de codificación en los segmentos grande (L), mediano (M) y pequeño (S).....	4
Figura 2.	Lesiones cloróticas observadas en plantas de cebolla asociadas a la infección de IYSV. Mapa de la distribución mundial de IYSV....	5
Figura 3.	Adulto de <i>T. tabaci</i> , vector de IYSV. Larvas y adultos en la base de las hojas internas de plantas de cebolla	7
Figura 4.	Sitios de colecta de plantas de cebolla con síntomas de “mancha amarilla” causada por IYSV	11
Figura 5.	Sitios de reconocimiento de los primers IYSV-KO1, IYSV-KO2, IYSV-KO3, IYSV-KO4, IYSV-KO5 e IYSV-KO6 para la amplificación del segmento S del genoma de IYSV	14
Figura 6.	Síntomas típicos y severos de “mancha amarilla” asociados a IYSV observados en plantas de cebolla colectadas en ocho municipios del estado de Morelos	17
Figura 7.	Plantas de <i>N. benthamiana</i> inoculadas mecánicamente con dos aislamientos de IYSV. Planta control, aislamiento típico (IYSV-T) y aislamiento severo (JIC1-18) mantenidas en condiciones de cámara bioclimática o invernadero	19
Figura 8.	ARN total de <i>N. benthamiana</i> inoculadas con aislamientos típicos o severos de <i>Iris yellow spot virus</i>	22
Figura 9.	Productos de PCR obtenidos con los primers IYSV917L e IYSV56U de plantas de cebolla que mostraban síntomas típicos (900 pb) o severos (500 pb).....	23

Figura 10. Frecuencia de plantas de cebolla con síntomas de mancha amarilla en cuatro ciclos de cultivo en el estado de Morelos que amplificaron un fragmento de 900 pb, 500 pb o ambos	25
Figura 11. Productos de PCR obtenidos con los primers IYSV-KO4 e IYSV-KO6 que amplifican el gen N + UTR5' provenientes de aislamientos típicos y severos de <i>Iris yellow spot virus</i>	27
Figura 12. Árbol filogenético basados en la secuencia de nucleótidos del gen N de <i>Iris yellow spot virus</i> . Aislamientos de IYSV provenientes de síntomas típicos o severos en cultivos de cebolla del estado de Morelos.....	29

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Cultivo de cebolla

El cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) es importante en varias partes del mundo por ser un ingrediente común en diferentes platillos debido a que se pueden encontrar bulbos de diferentes colores, formas y sabores (Shigyo y Kik, 2008). También posee propiedades antimicrobianas (Gent *et al.*, 2006), antioxidantes y de reducción de colesterol (Vidyavati *et al.*, 2010).

En 2013 a nivel mundial se cosecharon 230,180 ha de cebolla, Asia es el continente con mayor producción (64.2%) comparado con América (6.2%); en el mundo, México es el 14° país productor. A nivel nacional la cebolla ocupa el 18° lugar de los cultivos producidos y el 13° en exportación (FAO, 2016). En 2016 el estado de Morelos ocupó el octavo lugar en superficie sembrada y séptimo en producción a nivel nacional. Los principales municipios productores de cebolla de dicha entidad son Axochiapan, Ayala, Cuautla, Emiliano Zapata, Jantetelco, Jonacatepec, Temixco, Temoac, Tepalcingo, Tetecala, Tlaquiltenango, Xochitepec y Zacualpan de Amilpas (SIAP, 2016).

En Morelos la cebolla se produce en dos ciclos agrícolas, siendo el más importante el de otoño-invierno en el cual se obtiene 60% de la producción anual. En este ciclo, el trasplante inicia a mediados de agosto y termina en diciembre alcanzando una producción máxima en enero y febrero. Se siembran cultivares nacionales e híbridos y la selección del cultivar depende de la fecha en que se desee salir al mercado (Osuna-Canizalez y Ramírez-Rojas, 2013).

Las enfermedades en las plantas merman la calidad y disminuyen los rendimientos aumentando los costos de producción. En el cultivo de cebolla se han reportado diversas enfermedades de origen bacteriano, fúngico y viral causadas por diferentes microorganismos fitopatógenos como *Pantoea* spp., *Botrytis* spp., *Phoma terrestris*, *Alternaria porri*, *Peronospora destructor* y *Fusarium* spp. (Schwartz *et al.*, 2014), éstos tres últimos presentes en cultivos de cebolla de Morelos (Osuna-Canizalez y Ramírez-Rojas, 2013). En el caso de los virus, la enfermedad más importante en los últimos años es la "mancha amarilla" causada por el *Iris yellow spot virus* (Schwartz *et al.*, 2014).

1.2 Iris yellow spot virus (IYSV)

La familia *Bunyaviridae* incluye más de 350 virus agrupados en cinco géneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* y *Tospovirus* (Horne y Vanlandingham, 2014). A nivel mundial los tospovirus causan algunas de las enfermedades más destructivas en diversos cultivos de importancia agrícola ocasionando pérdidas anuales de más de 1 billón de dólares (Pappu *et al.*, 2009; Prins y Goldbach, 1998).

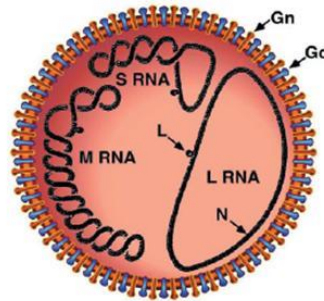
El IYSV pertenece a la familia *Bunyaviridae*, cuyas especies poseen viriones esféricos con un diámetro de 80-120 nm, envueltos por una cubierta externa de glicoproteínas la cual está rodeada de una bicapa lipídica de aproximadamente 5 nm de grosor (Figura 1A) (King *et al.*, 2012). Su genoma está compuesto de ARN monocatenario de sentido negativo o ambisentido, dividido en tres segmentos: grande (L), mediano (M) y pequeño (S), cuya longitud total oscila entre 11-19 kb

de acuerdo al género (Figura 1B) (King *et al.*, 2012; Horne y Vanlandingham, 2014).

El segmento L de 8.8 kb contiene un solo marco de lectura que codifica para la ARN polimerasa-ARN dependiente (RdRp) en la cadena viral complementaria (ARNvc) (Bag *et al.*, 2010); mientras que los segmentos M y S poseen marcos de lectura que codifican en ambos sentidos (Walter y Barr, 2011) (Figura 1B). El segmento M posee una longitud de 4.8 kb, codifica para el precursor de la glicoproteína (Gn/Gc) en la cadena ARNvc (Bag *et al.*, 2009), mismo que forma un heterodímero glicosilado que se asocia con el complejo de ribonucleoproteína (RNP) para mediar el ensamblaje y salida de partículas virales maduras; por su parte, la cadena viral de ARN (ARNv) codifica para la proteína no estructural NSm involucrada en el movimiento célula a célula en la planta infectada (Figura 1B) (Walter y Barr, 2011). El segmento S de 3.1 kb codifica para la proteína NSs (no estructural) y la N de la nucleocápside en las cadenas ARNv y ARNvc, respectivamente (Figura 1B) (Cortês *et al.*, 1998; Walter y Barr, 2011). La proteína NSs actúa como un supresor de la respuesta de defensa de la planta infectada. La proteína N se asocia al ARNv encapsulando los productos de replicación formando el complejo RNP (Walter y Barr, 2011).

Tomato spotted wilt virus (TSWV) fue el primer virus fitopatógeno clasificado dentro del género *Tospovirus* siendo además la especie tipo (Milne y Francki, 1984; de Haan *et al.*, 1989). Ocho especies de virus fueron ubicadas posteriormente en este género y existen 15 más en análisis para ser incluidas en el mismo (King *et al.*, 2012).

A Virión de bunyavirus



B Genoma de *Tospovirus*

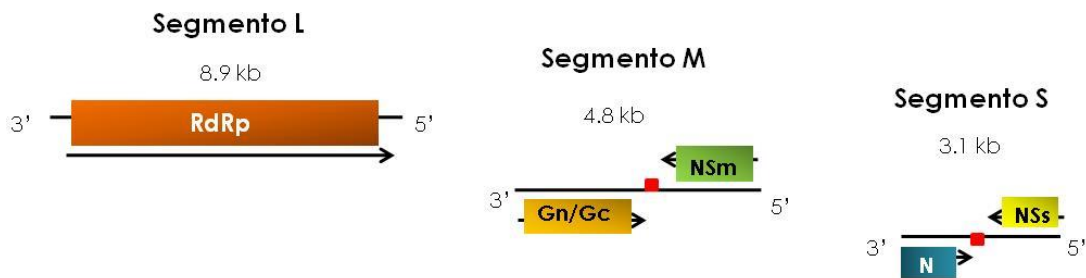


Figura 1. A. Virión de las especies de la familia *Bunyaviridae*. B. Genoma del género *Tospovirus* y estrategia de codificación en los segmentos grande (L), mediano (M) y pequeño (S). RdRp: RNA polimerasa-RNA dependiente, Gn/Gc: glicoproteína; NSm: proteína no estructural de movimiento, NSs: proteína no estructural relacionada con silenciamiento génico y N: proteína de la nucleocápside (Modificadas de King *et al.*, 2012).

IYSV fue descrito inicialmente en plantas de *Iris hollandica* (Cortês *et al.*, 1998). En la actualidad se conoce que IYSV infecta de manera natural a plantas de 44 familias (CABI, 2016), entre las que destacan varias especies del género *Allium* incluyendo a la cebolla (Gera *et al.*, 1998; Pappu *et al.*, 2006a; Gent *et al.*, 2006).

En cebolla el IYSV ocasiona manchas cloróticas de forma alargada o de diamante que se vuelven de color pajizo y aspecto seco, con ausencia o

presencia de islas verdes, las cuales pueden coalescer provocando la necrosis y muerte prematura de la planta (Figura 2A) (Hall *et al.*, 1993; Gent *et al.*, 2006).

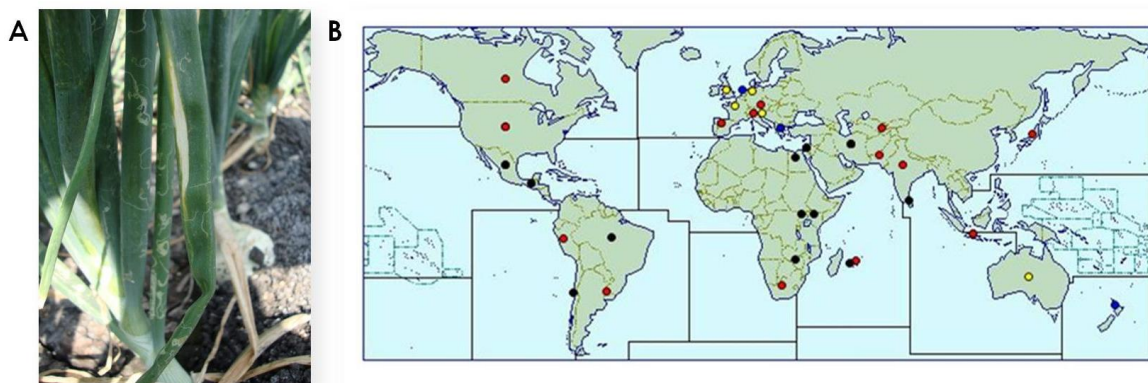


Figura 2. A. Lesiones cloróticas observadas en plantas de cebolla asociadas a la infección de IYSV. **B.** Mapa de la distribución mundial de IYSV. Los puntos indican la presencia de la enfermedad (●), distribución amplia (●), localizada (●) y ocasional (●) (CABI, 2016).

El IYSV se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial (Figura 2B) (Gent *et al.*, 2006; CABI, 2016). La descripción de síntomas y la caracterización molecular de aislamientos de IYSV ha permitido el desarrollo de protocolos para su detección en varios países como Israel (Gera *et al.*, 1998), Brasil (Poizzer *et al.*, 1999), Eslovenia (Mavric y Ravnikar, 2001), Italia (Cosmi *et al.*, 2003; Tomassoli *et al.*, 2009), Australia (Coutts *et al.*, 2003), Japón (Murai, 2004), Chile (Rosales *et al.*, 2005), España (Córdoba-Sellés *et al.*, 2005), Perú (Mullis *et al.*, 2006), Guatemala (Nischwitz *et al.*, 2007), Reunion Island (Robène-Soustrade *et al.*, 2006), India (Ravi *et al.*, 2006), Alemania (Leinhos *et al.*, 2007), Nueva Zelanda (Ward *et al.*, 2008), Francia (Huchette *et al.*, 2008), Serbia (Bulajić *et al.*, 2009), Mauricio (Lobin *et al.*, 2010), Kenia y Uganda (Birithia *et al.*, 2011), Pakistán (Iffikhar *et al.*, 2014), Indonesia (Pappu y Rauf, 2013), Egipto (Hafez *et al.*, 2014), Estados Unidos (Schwartz *et al.*,

2002; Abad *et al.*, 2003; Gent *et al.*, 2004; du Toit *et al.*, 2004; Mullis *et al.*, 2004; Creamer *et al.*, 2004; Crowe y Pappu, 2005; Miller *et al.*, 2006, Pappu y Matheron, 2008; Sether *et al.*, 2010), Zimbabue (Karavina *et al.*, 2016) y México (Velásquez-Valle *et al.*, 2016; Ramírez-Rojas *et al.*, 2016).

El principal daño causado por IYSV en cebolla es la reducción del tamaño del bulbo (Gent *et al.*, 2004) y se estimó que una pérdida de rendimiento de 10-15% podría tener un impacto económico de 60 a 90 millones de dólares en el oeste de Estados Unidos, sin contar los costos requeridos para el control de *Thrips tabaci*, vector del virus, que van de 7.5 a 12.5 millones de dólares (Gent *et al.*, 2006).

La incidencia y severidad ocasionada por IYSV varía con el desarrollo de la planta incrementándose en la etapa de formación del bulbo (Fichtner *et al.*, 2004; Hammon, 2004). Se han reportado incidencias hasta del 85% y severidad de 50-75% (Lobin *et al.*, 2010; BIRTHIA *et al.*, 2011; Karavina *et al.*, 2016; Velásquez-Valle *et al.*, 2016). En Brasil esta enfermedad tuvo una incidencia de 100% provocando la pérdida total de bulbo y semilla (Pozzer *et al.*, 1994).

1.3 *Thrips tabaci*

Los tospovirus se transmiten por trips de la familia *Thripidae* (Riley *et al.*, 2011). Los adultos de estos insectos poseen un cuerpo delgado de 1-2 mm de longitud, con dos pares de alas y antenas segmentadas (Figura 3A) (Lewis, 1973; Riley *et al.*, 2011). IYSV es específicamente adquirido por *Thrips tabaci*, principal plaga del cultivo de cebolla (Kritzman *et al.*, 2001), y transmitido de manera

circulativa, propagativa y persistente (Whitfield *et al.*, 2015). Su ciclo de vida consta de huevo, primero y segundo instar larval (L1 y L2), prepupa, pupa y adulto (Lewis, 1973). Los trips únicamente pueden transmitir al virus cuando es adquirido en etapa L1 permaneciendo virulíferos el resto de su vida; los adultos sanos pueden adquirir al virus pero no pueden transmitirlo (Riley *et al.*, 2011). El IYSV no es transmitido de manera transovárica ni por semilla (Kritzman *et al.*, 2001).

En cebolla los trips se encuentran en o cerca de los espacios protegidos en la superficie de la planta, larvas y adultos se alimentan directamente de las hojas transmitiendo a IYSV y dañando el tejido vegetal lo que reduce su capacidad fotosintética. Kritzman *et al.* (2001) determinaron que la concentración más elevada de virus es generalmente encontrada en las hojas internas más cercanas al bulbo de la planta, sitio de preferencia para la alimentación y protección de los trips (Figura 3B).

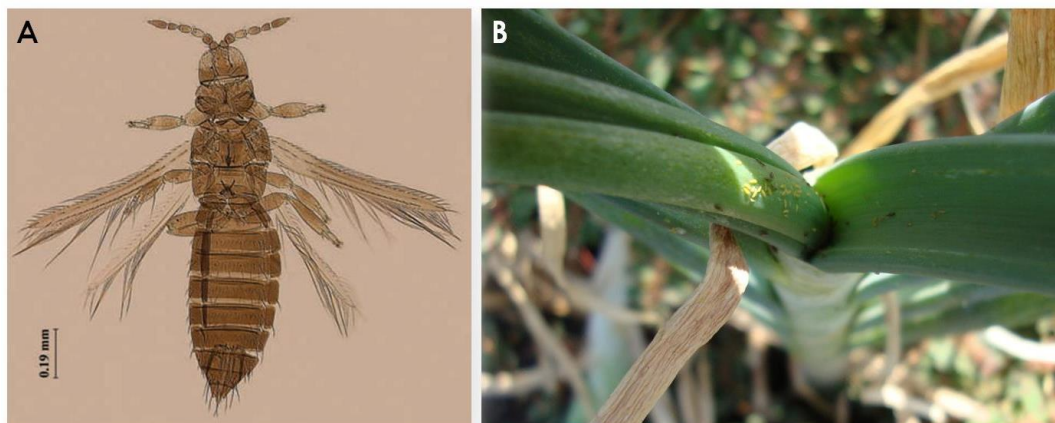


Figura 3. A. Adulto de *T. tabaci*, vector de IYSV (Tomada de Riley *et al.*, 2011). **B.** Larvas (color amarillo) y adultos (color oscuro) en la base de las hojas internas de plantas de cebolla.

1.4 Variabilidad biológica y molecular de IYSV

El gen N que codifica para una nucleoproteína en el segmento S es comúnmente utilizado para detectar tospovirus; además, por su alto grado de divergencia también se utiliza para separar especies dentro del género (Pappu *et al.*, 2006b). Estudios filogenéticos basados en la secuencia de este gen han demostrado la existencia de variaciones entre aislamientos de IYSV procedentes de la misma localidad, estado o país (Abad *et al.*, 2003). Asimismo, se ha encontrado gran similitud filogenética entre aislamientos procedentes de diversos países lo cual sugiere un importante flujo genético (Bulajjić *et al.*, 2009; Nischwitz *et al.*, 2007; Pappu *et al.*, 2006b). La divergencia entre aislamientos de IYSV podría reflejar una adaptación de éstos a diferentes hospedantes y condiciones ambientales (Pozzer *et al.*, 1999).

El análisis de diferentes aislamientos de IYSV mediante la respuesta de patogenicidad en diversos hospedantes ha permitido determinar la variabilidad biológica del virus, la cual se basa en la expresión de síntomas, severidad y periodo de incubación en la especie inoculada, entre otras variables (Bag *et al.*, 2012b).

1.5 IYSV en Morelos

En el ciclo de cultivo 2012-2013, en el estado de Morelos se registró una incidencia de "mancha amarilla" asociada a IYSV de 100% y una severidad superior a 90% con pérdidas de 50-100% de producción en el cultivo de cebolla (Osuna-Canizalez y Ramírez-Rojas, 2013; Ramírez-Rojas *et al.*, 2016). En esta

entidad se han observado dos tipos de síntomas: a) manchas secas amarillas a blanquecinas con halo clorótico y forma alargada y b) manchas secas blancas con o sin halo clorótico y alargadas.

Estos resultados sugieren, entre otras cosas, que ambos aislamientos de IYSV difieren biológica y molecularmente entre sí.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterizar biológica y molecularmente dos aislamientos de IYSV asociados al cultivo de cebolla en el estado de Morelos.

2.2 Objetivos específicos

- Conocer el período de incubación y los síntomas ocasionados por dos aislamientos de IYSV en *Nicotiana benthamiana*.
- Determinar si existen diferencias entre las secuencias del segmento S de ambos aislamientos de IYSV.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta de muestras

En el ciclo 2014-2015 se recorrieron parcelas de cebolla en los municipios de Ayala, Axochiapan, Emiliano Zapata, Jojutla, Puente de Ixtla, Tlaquiltenango, Xochitepec y Zacatepec (Figura 4) en las cuales se colectaron plantas completas que presentaban síntomas de “mancha amarilla”. Las plantas colectadas se trasladaron al laboratorio donde se separaron con base en los síntomas observados. Posteriormente, se cortaron trozos de tejido foliar de cada una de ellas, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

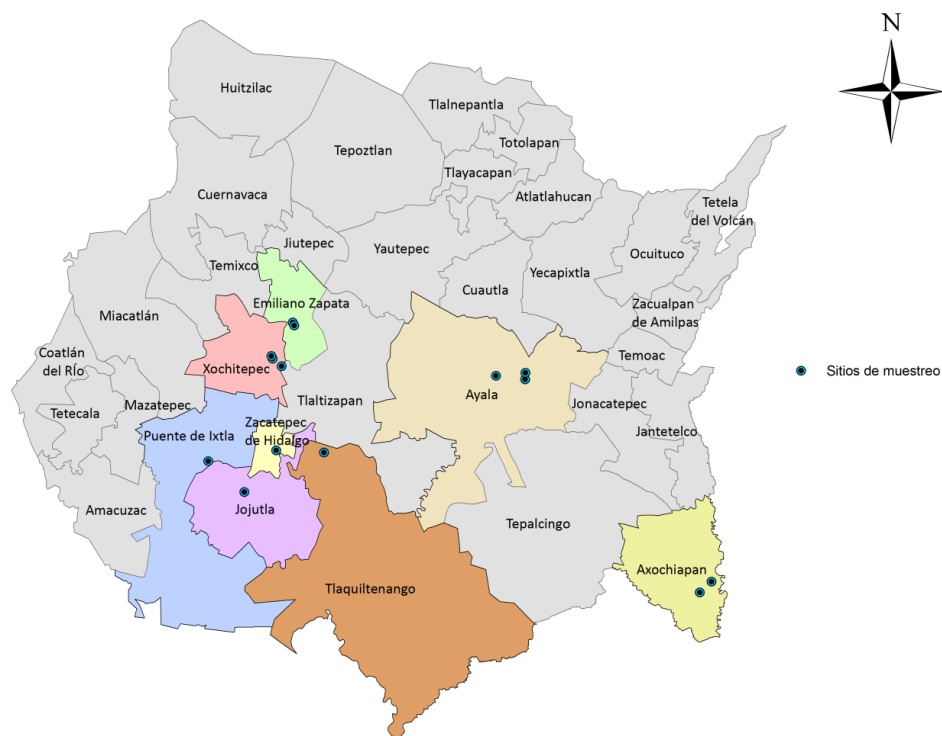


Figura 4. Sitios de colecta de plantas de cebolla con síntomas de “mancha amarilla” causada por IYSV.

3.2 Inoculación mecánica

Se inocularon mecánicamente cinco plantas de *Nicotiana benthamiana* utilizando como fuente de inóculo 0.1 g de tejido de cebolla mantenido a -80°C con síntomas clasificados como típicos o severos. El tejido fue macerado en 1 ml de buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 7.0 + sulfito de sodio 0.1 M + β -mercaptoetanol 0.01 M (Mandal *et al.*, 2006). El macerado se mantuvo en hielo y se frotó con un hisopo sobre cuatro hojas de cada planta previamente espolvoreadas con carborundum 400 mallas. Como control negativo se utilizaron dos plantas de *N. benthamiana* frotadas únicamente con el buffer. Las plantas inoculadas fueron mantenidas en dos condiciones ambientales: **a)** en cámara bioclimática y **b)** invernadero. En ambos casos se registró la temperatura y humedad relativa con un higrotermógrafo digital (HOBOWare® Pro).

3.3 Extracción de ARN total

Se realizó a partir de 0.1 g de tejido foliar de cebolla con cada uno de los dos síntomas, así como de tejido asintomático de las plantas colectadas en campo y de 0.25 g de plantas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente. En este último caso, la extracción se realizó a los 10, 15 y 20 días post-inoculación (dpi) tanto de las plantas inoculadas como de los controles negativos. En todos los casos el tejido fue macerado en nitrógeno líquido y el ARN total fue extraído con TriReagent® (Ambion®) siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN fue diluido en 30 μ l de buffer TE 0.1X (Tris-EDTA) preparado con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC); se determinó su concentración y calidad en un Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Inc) mientras que

la integridad se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) utilizando 1 µg.

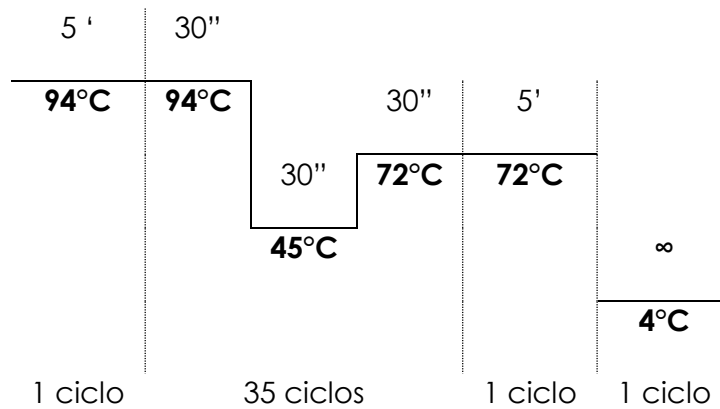
3.4 Retrotranscripción

Se realizó a partir de una mezcla que contenía 1 µg de ARN total y 0.5 µM de primer reverso en un volumen de 12 µL. Los tubos se incubaron a 70°C por 5 min y después se mantuvieron en hielo para agregarles 8 µL de una mezcla que contenía M-MLV buffer 1X, DTT 0.1 M, dNTP Mix 200 µM, 20 U de RNasin® y 1 U de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) para tener un volumen final de 20 µL. La síntesis de cDNA se realizó a 42°C durante 60 min seguido de un período de 70°C por 10 min.

3.5 PCR

Se utilizaron los primers específicos para IYSV: IYSV917L e IYSV56U que amplifican el gen N completo (Robène-Soustrade *et al.*, 2006) con el programa de amplificación señalado en el Cuadro 1. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) a 85V durante 35 min; posteriormente fueron purificados con Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y secuenciados.

Cuadro 1. Programa de PCR para detección de IYSV.



3.6 Diseño de primers específicos para el segmento S de IYSV

Con base en la secuencia AF001387 del IYSV depositada en el GenBank, se diseñaron seis primers con el programa Vector NTI® Suite 8.0 para amplificar la totalidad del segmento S del virus (Figura 5).

Organización del segmento S de IYSV

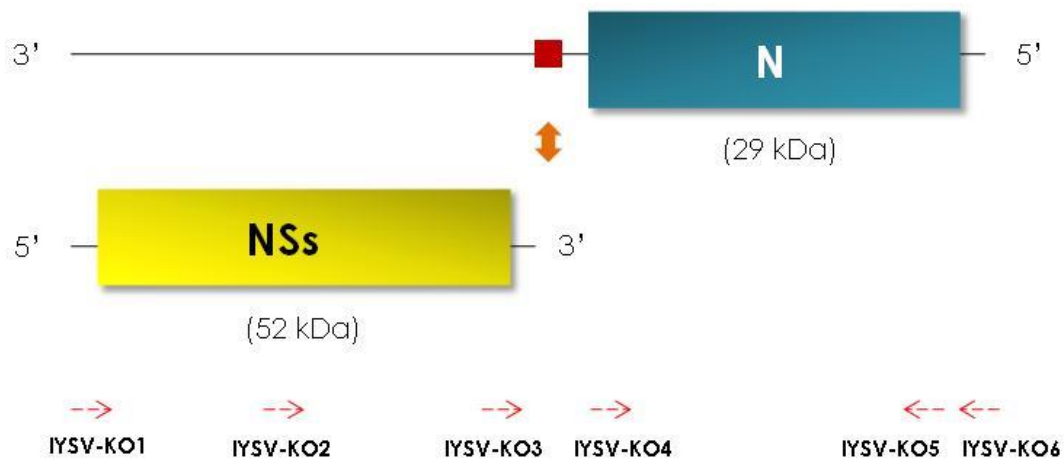
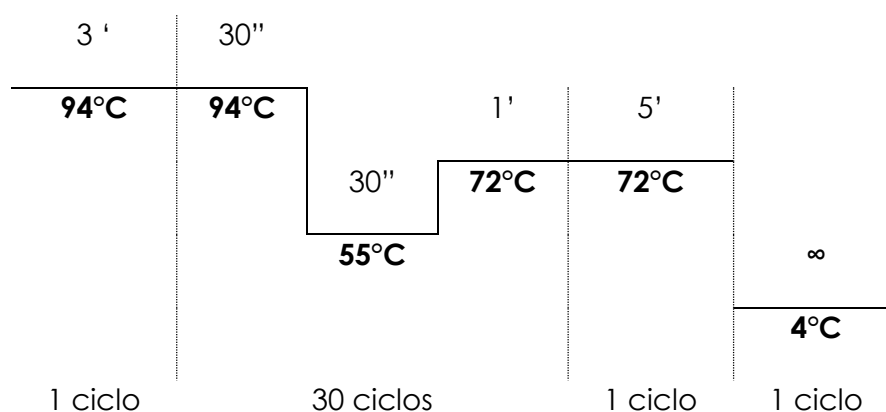


Figura 5. Sitios de reconocimiento de los primers IYSV-KO1, IYSV-KO2, IYSV-KO3, IYSV-KO4, IYSV-KO5 e IYSV-KO6 para la amplificación del segmento S del genoma de IYSV. NSs: proteína no estructural, N: proteína de la nucleocápside.

La temperatura de fusión, tiempo de desnaturalización y de elongación de cada par de primers fue determinada mediante gradientes de temperatura (Master Cycler® Gradient Thermal Cycler, Eppendorf). La reacción de PCR se realizó con los primers IYSV-KO1, IYSV-KO2, IYSV-KO3 e IYSV-KO4 en combinación con los primers IYSV-KO5 ó IYSV-KO6 de ambos aislamientos de IYSV. La mezcla consistió en High Fidelity PCR buffer 1X, MgSO₄ 2.0 mM, dNTP Mix 200 µM, 0.2 µM de cada primer, 1 U de Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen™) y 2.0 µL de cDNA, en un volumen final de 25 µL. Como control interno se amplificó una región del gen ribosomal 18S ARNr (Cuadro 2) (Zamboni *et al.*, 2008). Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.75%, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y observados en un fotodocumentador (Quantum® Vilber Lourmat). Los productos amplificados se purificaron con Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) para su secuenciación.

Cuadro 2. Programa de PCR para amplificación del gen 18S ARNr.



3.7 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas del gen N fueron editadas con el programa Chromas Lite 2.0, posteriormente se generaron secuencias consenso con el programa Vector NTI™ Suite 8.0 las cuales fueron comparadas con la base de datos del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y depositadas en este mismo sitio.

3.8 Caracterización genotípica

Las secuencias obtenidas con los primers IYSV-KO4 e IYSV-KO6 de los dos aislamientos en estudio fueron digeridas virtualmente con *HinfI* para su análisis *In silico* por RFLP para conocer su patrón de restricción con el programa Vector NTI™ Suite 8.0. El alineamiento múltiple se llevó a cabo con las secuencias obtenidas de ambos aislamientos y las registradas en la base de datos del GenBank que mostraron mayor identidad con el gen N de IYSV utilizando ClustalW (Iftikhar *et al.*, 2014). Asimismo, se hizo un análisis filogenético por el método Neighbor-joining (2000 repeticiones) con el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

4. RESULTADOS

4.1 Colecta de muestras

Se colectaron 78 plantas de cebolla que presentaban síntomas de “mancha amarilla” asociados a IYSV en 14 localidades de los ocho municipios recorridos del estado de Morelos en el ciclo 2014-2015 (Figura 4). Las plantas colectadas fueron de seis variedades de cebolla: Stratus (33.3%), Carta Blanca (24.4%), Florentina (10.2%), Cirrus (6.4%), Cal 214 (6.4%) y Joya (2.6%); el 16.7% restante de las muestras no fue posible identificar la variedad. Con base en los síntomas observados en las plantas colectadas se tuvieron dos grupos: a) **típicos**: manchas secas amarillas a blanquecinas con halo clorótico y forma alargada y b) **severos**: manchas de aspecto seco, blancas con o sin halo clorótico y alargadas, ocupando gran parte de la lámina foliar (Figura 6). En el primer caso se seleccionaron cuatro aislamientos y en el segundo cinco para tener un total de nueve muestras a las cuales se les asignó un número de identificación (Cuadro 3).

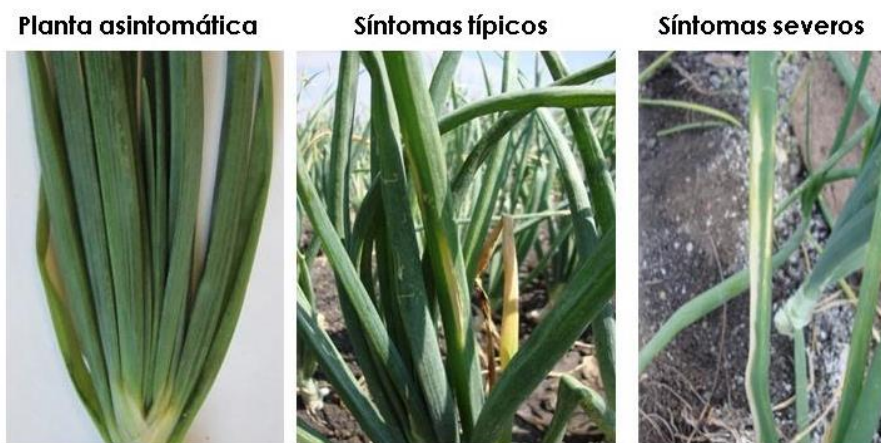


Figura 6. Síntomas típicos y severos de “mancha amarilla” asociados a IYSV observados en plantas de cebolla colectadas en ocho municipios del estado de Morelos.

4.2 Inoculación mecánica

Las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con aislamientos típicos o severos manifestaron diferentes síntomas en las dos condiciones ambientales en las que se mantuvieron en post-inoculación independientemente de la fuente de inóculo (Cuadro 3). En la cámara bioclimática se tuvo una temperatura media de 25°C, 91% de humedad relativa (HR) promedio, 77% de HR mínima y 99% de HR máxima; con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Con excepción de los aislamientos Cb 1 y Cb 2 (típico y severo, respectivamente) que no provocaron síntomas, en el resto de las plantas inoculadas tanto con aislamientos típicos como severos se observaron síntomas sistémicos consistentes en necrosis de nervaduras, constricción de peciolo, lesiones necróticas foliares rodeadas por un halo café oscuro, clorosis y marchitamiento (Figura 7). En promedio, el período de incubación fue de 7 dpi y en la mayoría de los casos las hojas se mostraban completamente marchitas a los 22 dpi.

En invernadero se tuvo una temperatura promedio de 25°C, mínima de 13°C y 39°C máxima; 50% de HR promedio, 27% de HR mínima y 71% de HR máxima. En estas condiciones se observaron síntomas sistémicos distintos a los registrados en la cámara bioclimática consistentes en clorosis, enroscamiento de hojas y marchitamiento (Figura 7). Estos síntomas se observaron tanto en plantas inoculadas con aislamientos típicos como severos. En todos los casos se tuvo un período de incubación de 10 días. El aislamiento TNX1-18 (típico) no produjo

síntomas. En esta condición todas las plantas inoculadas mostraron marchitez a los 30-35 dpi.

Síntomas en *N. benthamiana*

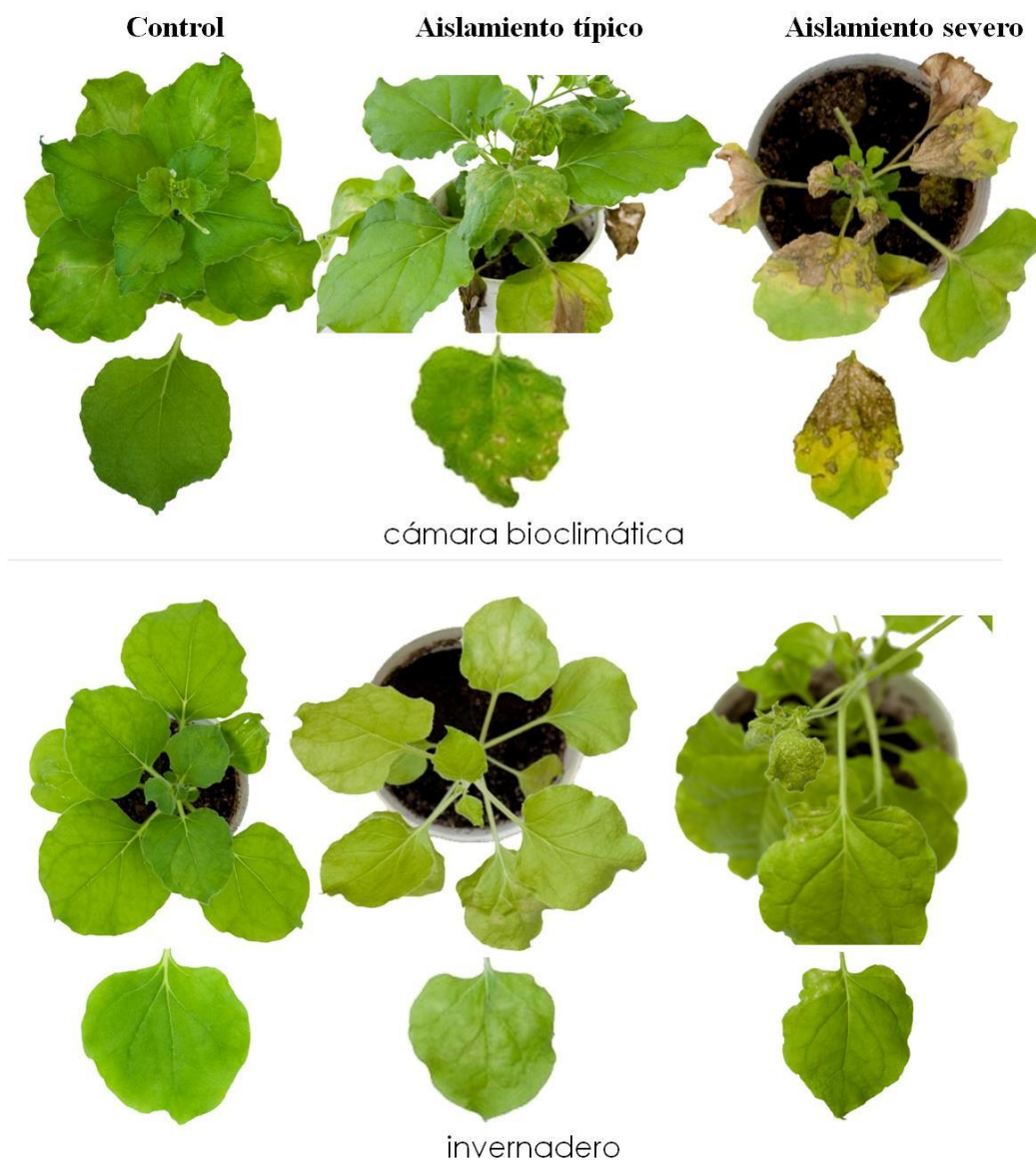


Figura 7. Plantas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente con dos aislamientos de IYSV. Planta control, aislamiento típico (IYSV-T) y aislamiento severo (JIC1-18) mantenidas en condiciones de cámara bioclimática ó invernadero.

Cuadro 3. Síntomas observados en plantas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente con aislamientos típicos o severos de *Iris yellow spot virus* en dos condiciones post-inoculación.

Aislamiento	Síntoma cebolla	Síntomas en <i>N. benthamiana</i>	
		Cámara bioclimática	Invernadero
Cb1	Típico	Ss*	Is, Lc, Ar, M
Cb2	Severo	Ss	Is, Lc, Ar, M
JIC1-18	Severo	Is, Ln, Nn, Ar, M	Is, Lc, Ar, En, M
JIC5-18	Severo	Is, Ln, Nn, Ar, M	Is, Lc, Ar, M
TNX1-18	Típico	Is, Ln, Nn, Lc, Ar, M	Ss
PF2	Típico	Ne	Is, Lc, Ar, M
IYSV-T	Típico	Is, Lc, Ln, M, Ar	Is, Lc, Ar, M
IYSV-2	Severo	Is, Ln, Nn, M, Ar	Is, Lc, Ar, M
IYSV-S3	Severo	Is, Lc, Ln, M, Ar	Is, Lc, Ar, M

*Ss: sin síntomas, Is: infección sistémica, Lc: lesiones locales cloróticas, Ln: lesiones locales necróticas, Nn: necrosis de nervaduras, M: marchitamiento, Ar: arrugamiento de hojas, En: enrollamiento de hojas y Ne: no evaluada.

4.3 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con aislamientos típicos o severos de IYSV permitió observar las bandas correspondientes a los tres segmentos del genoma del virus (L, M y S) sólo en las muestras tomadas a los 20 dpi (Figura 8). El tamaño de los segmentos coincide con los reportados previamente (Bag *et al.*, 2009; Bag *et al.*, 2010; King *et al.*, 2012). Las plantas de *N. benthamiana* en las cuales se observaron los tres segmentos del genoma viral fueron las inoculadas con los aislamientos Cb1 (típico), Cb 2 y JIC1-18 (severos) mantenidas en invernadero, y en aquellas inoculadas con los aislamientos IYSV-2, IYSV-S y JIC1-18 (severos) mantenidas en cámara bioclimática (Figura 8). No se observaron los segmentos del genoma viral en las plantas inoculadas con JIC5-18 (severo) y TNX 1-18 (típico) en ninguna de las dos condiciones ambientales a pesar de que las plantas mostraban síntomas (Cuadro 3).

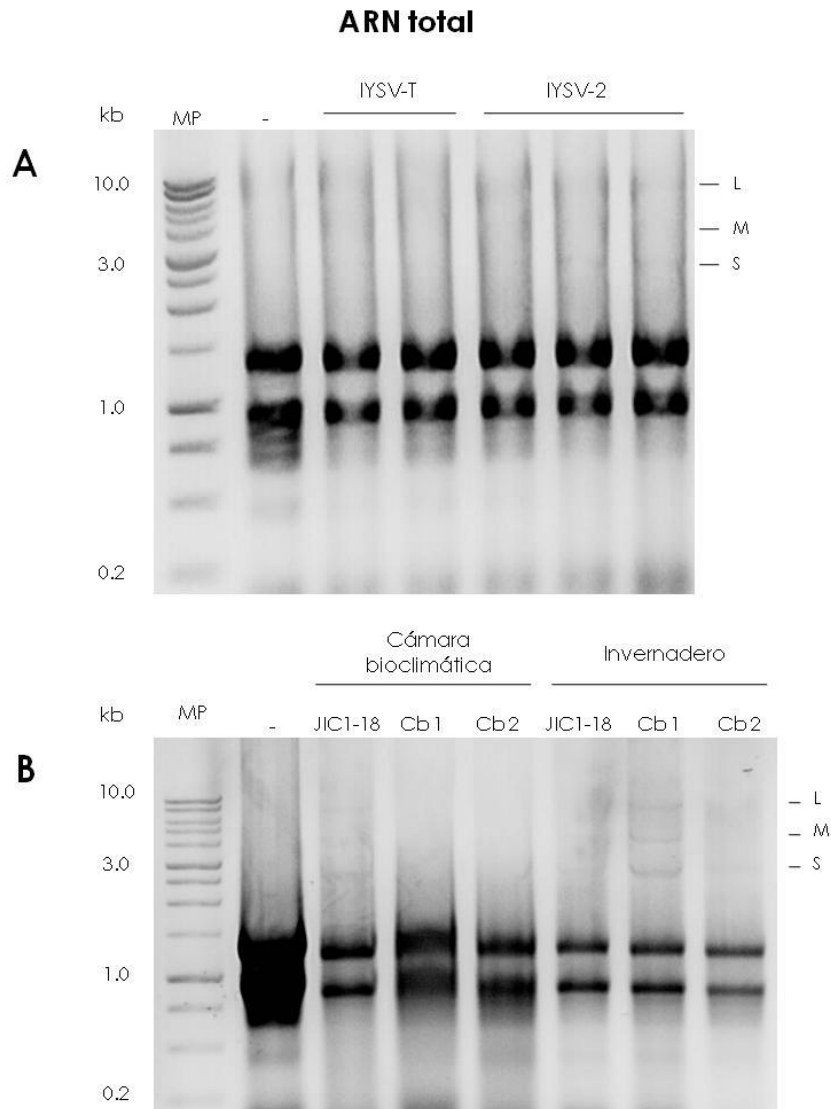


Figura 8. ARN total de *N. benthamiana* inoculadas con aislamientos típicos o severos de *Iris yellow spot virus*. **A.** ARN total de las plantas inoculadas con los aislamientos IYSV-T (típico) e IYSV-2 (severo) a los 20 dpi mantenidos en cámara bioclimática. **B.** ARN total de plantas inoculadas con los aislamientos JIC1-18 (severo), Cb1 (típico) y Cb2 (severo) mantenidas en dos condiciones ambientales. Gel de agarosa 1% con 1 μ g de ARN total. MP: marcador de peso molecular 1 kb (Promega); -: planta control frotada con buffer de fosfatos. L, M, S: segmentos grande, mediano y pequeño de IYSV, respectivamente.

4.4 PCR

En todas las muestras de cebolla con síntomas de “mancha amarilla” colectadas en los ocho municipios del estado de Morelos se detectó al IYSV. En las muestras con síntomas típicos se amplificó un fragmento de aproximadamente 900 pb correspondiente a un segmento del gen N de este virus. Sin embargo, en plantas con síntomas severos se obtuvo un amplicón de alrededor de 500 pb (Figura 9). Los resultados de la secuenciación mostraron que ambos segmentos (900 y 500 pb) tuvieron 99% de identidad con la nucleoproteína de IYSV reportadas en el GenBank. Con base en esto último, los amplicones de 900 y 500 pb se asociaron a los síntomas típicos o severos, respectivamente.

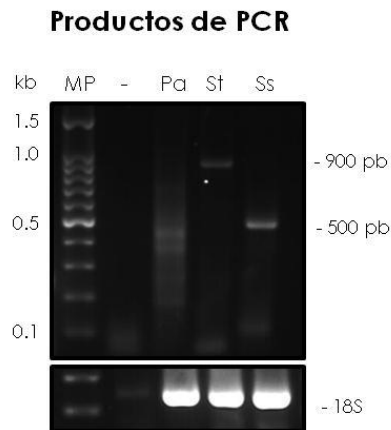


Figura 9. Productos de PCR obtenidos con los primers IYSV917L e IYSV56U (Robène-Soustrade *et al.*, 2006) de plantas de cebolla que mostraban síntomas típicos (≈ 900 pb) o severos (≈ 500 pb). Los primers amplifican un segmento de 896 pb que corresponde al gen N de IYSV. Gel de agarosa 1%. MP: marcador de peso molecular 100 pb (Promega), -: testigo negativo agua,

Pa: planta asintomática, St: síntoma típico (≈ 900 pb), Ss: síntoma severo (≈ 500 pb), 18S: control interno gen 18S ARNr.

Con estos resultados se procedió a analizar muestras de cebolla de cuatro ciclos de cultivo (2011 a 2015) con síntomas de “mancha amarilla”. Los resultados mostraron que en el ciclo 2011-2012 el 64.3% de las muestras analizadas amplificaron únicamente el fragmento de 900 pb, porcentaje que fue disminuyendo en los ciclos posteriores hasta no detectarse plantas que amplificaran este fragmento en el ciclo 2014-2015 (Figura 10). Por otro lado, en el ciclo 2011-2012 el 35.7% de las muestras analizadas amplificaron el fragmento de 500 pb, porcentaje que aumentó en el siguiente ciclo para disminuir nuevamente e incrementarse a 76.9% en el ciclo 2014-2015 (Figura 10). En el caso de las muestras que amplificaron ambos segmentos (900 y 500 pb) se observó que el mayor porcentaje (60%) se tuvo en el ciclo 2013-2014 con valores menores en el ciclo previo y posterior (12.5 y 23.1%, respectivamente). Finalmente, no se tuvieron muestras que amplificaran ambos segmentos en el ciclo 2011-2012 (Figura 10).

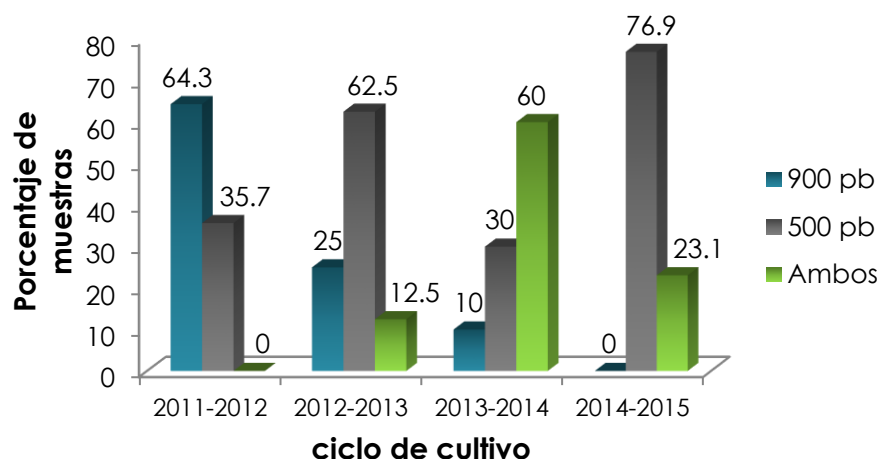


Figura 10. Frecuencia de plantas de cebolla con síntomas de mancha amarilla en cuatro ciclos de cultivo en el estado de Morelos que amplificaron un fragmento de 900 pb, 500 pb o ambos.

4.5 *Diseño de primers específicos para el segmento S de IYSV*

Se diseñaron seis primers que amplifican de manera sucesiva la totalidad del segmento S de IYSV incluidas las zonas conservadas no traducidas (UTR) de los extremos 3' y 5' (Figura 5) (Cuadro 4).

Los productos de PCR obtenidos con los primers IYSV-KO4 e IYSV-KO6 tuvieron el tamaño esperado de aproximadamente 1, 100 pb que incluye el gen N + UTR5' (Figura 11), mientras que la combinación de los primers IYSV-KO1, IYSV-KO2 e IYSV-KO3 con IYSV-KO6 tuvieron amplificaciones inespecíficas. En ningún caso se tuvo amplificación con IYSV-KO5. Con base en estos resultados de procedió a optimizar las condiciones de PCR con los primers IYSV-KO4 e IYSV-KO6 (Cuadro 5).

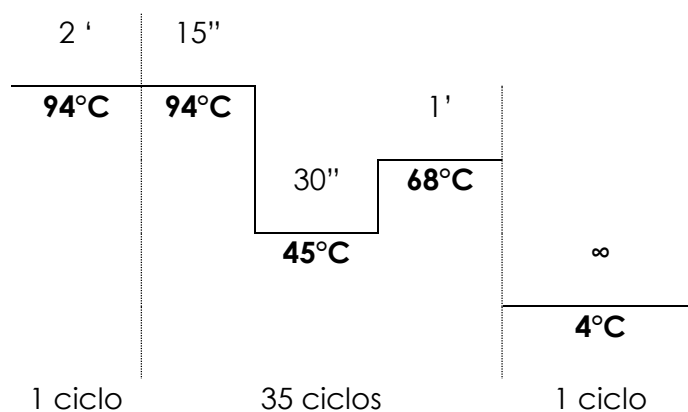
Todos los aislamientos típicos o severos analizados en el presente estudio amplificaron el fragmento esperado de 1,100 pb con los primers IYSV-KO4 e IYSV-KO6 (Figura 11).

Cuadro 4. Primers diseñados para la amplificación del segmento S de *Iris yellow spot virus*.

Primer	Longitud (nt)	Secuencia (5'-3')	Ubicación (nt)	Tm* (°C)
IYSV-KO1	19	AGAGCAATCGAGGTACAAA	1-19	44.5
IYSV-KO2	22	TACTGGAAAGAGAATATGGACA	626-647	46.0
IYSV-KO3	21	AGGACACTTCACTGTAGAAGA	1372-1392	42.7
IYSV-KO4	24	CTTAAC TAACACAAATACTG	2010-2033	43.7
IYSV-KO5	19	CACCATGTCTACCGTTAGGGTGA	3017-3035	44.0
IYSV-KO6	20	AGAGCAATCGAGGTATAAAAC	3086-3105	43.8

*Tm calculada con el programa Vector NTI® Suite 8.0

Cuadro 5. Programa de PCR para amplificación del gen N de IYSV con los primers IYSV-KO4 e IYSV-KO6.



Productos de PCR

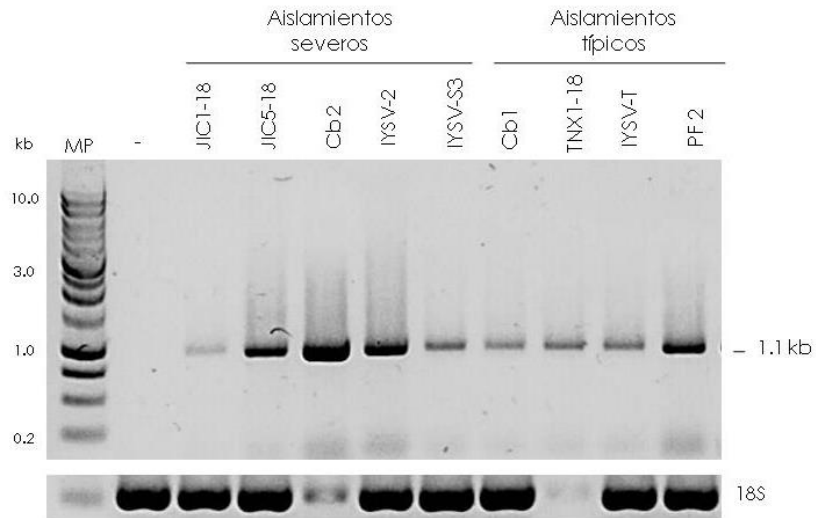


Figura 11. Productos de PCR obtenidos con los primers IYSV-KO4 e IYSV-KO6 que amplifican el gen N + UTR5' provenientes de aislamientos típicos y severos de *Iris yellow spot virus*. Gel de agarosa 1.2%. MP: marcador de peso molecular 1 kb (Promega), -: planta asintomática, 18S: control interno gen 18S ARNr.

4.6 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas con los primers IYSV-KO4 e IYSV-KO6 fueron registradas en la base de datos del GenBank (Cuadro 6). Estas secuencias tuvieron 98-99% de identidad con la nucleoproteína del gen N de IYSV y 96-98% con la nucleoproteína en la secuencia de aminoácidos pronosticada. Las secuencias del gen N de IYSV de mayor identidad disponibles en el GenBank fueron usadas para el análisis filogenético (Figura 12).

Cuadro 6. Número de acceso en GenBank de secuencias del gen N procedentes de aislamientos típicos o severos de *Iris yellow spot virus*.

Aislamiento/síntoma*	No. Acceso GenBank
Cb1/T	KX434621
Cb2/S	KX434622
‡JIC1-18 C/S	KX443600
¥JIC1-18 I/S	KX443601
JIC5-18/S	KX443602
PF2/T	KX443603
TNX1-18/T	KX443604
IYSV-T/T	KX443599
IYSV-2/S	KX434623
IYSV-S3/S	KX443598

* T: típico, S: severo. Muestra proveniente del aislamiento JIC1-18 evaluado en cámara (‡) e invernadero (¥).

4.7 Caracterización genotípica

En todos los aislamientos la digestión virtual con *Hinfl* de las secuencias obtenidas con los primers IYSV-KO4 e IYSV-KO6 generó un patrón de restricción que incluía un fragmento de 308 pb que corresponde con el genotipo IYSV_{BR} descrito por Iftikhar *et al.* (2014). Por otro lado, el análisis filogenético mostró que los aislamientos de IYSV de Morelos tienen mayor similitud con aquellos provenientes principalmente de Norteamérica (Figura 12A). A su vez, éstos se concentran en un clado y se dividen en tres grupos: **I)** JIC5-18 (KX443602), JIC1-18I (KX443601), IYSV-T (KX443599), IYSV-S3 (KX443598) e IYSV-2 (KX434623); **II)** incluye a Cb1 (KX434621), Cb2 (KX434622), JIC1-18C (KX443600) y TNX1-18 (KX443604); y **III)** con PF2 (KX443603) (Figura 12B).



Figura 12. A. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen N de *Iris yellow spot virus*. **B.** Aislamientos de IYSV provenientes de síntomas típicos o severos en cultivos de cebolla del estado de Morelos (●).

5. DISCUSIÓN

La mayor parte de los reportes relacionados con IYSV tratan de su caracterización molecular, distribución geográfica y diversidad genética (Pappu *et al.*, 2006; Bulajić *et al.*, 2009; Iftikhar *et al.*, 2014). En contraste, son pocos los reportes sobre caracterización biológica debido a la falta de protocolos diseñados para tal fin, así como las dificultades para establecer los postulados de Koch (Poizzer *et al.*, 1999; Bag y Pappu, 2009; Bag *et al.*, 2012b). Otro factor que ha contribuido a lo anterior es la dificultad para transmitir mecánicamente al IYSV en hospedantes experimentales (Bulajić *et al.*, 2009). El porcentaje de muestras de cebolla con síntomas de “mancha amarilla” que amplificaron el segmento de 900 ó 500 pb tuvo un comportamiento diferente en los diferentes ciclos de cultivo.

De acuerdo con García-Arenal *et al.* (2001) los cambios en las propiedades y divergencia genética entre aislamientos sugiere la presencia de variantes de un mismo virus. La primera se basa en la respuesta de hospedantes experimentales que permiten diferenciar la capacidad patogénica. Por ejemplo, en el caso de *Tobacco mosaic virus* (TMV) se determinó la presencia de variantes al inocular diferentes aislamientos del virus en plantas de *Nicotiana tabacum* que provocaban respuestas de susceptibilidad y resistencia (Scholthof, 2008). Por otro lado, De la Torre-Almaraz *et al.* (2002) mencionan la posible presencia de variantes de TSWV con base en la expresión de síntomas en hospedantes susceptibles. Mientras que Aramburu y Martí (2003) determinaron la presencia de

una variante severa de TSWV capaz de romper la resistencia del gen Sw-5 de plantas de tomate e induciendo infección sistémica.

En el caso de IYSV, se ha establecido un grupo de hospedantes experimentales en los que es posible diferenciar aislamientos del virus (Bag y Pappu, 2009; Bag *et al.*, 2012b). La evaluación biológica de los aislamientos típicos y severos de IYSV de Morelos mostró diferencias en la severidad de los síntomas en *N. benthamiana* asociado a la condición ambiental en la que se mantuvieron post-inoculación independientemente de la fuente de inóculo. Sin embargo, los aislamientos severos fueron menos virulentos en condiciones de invernadero. Por el contrario, en cámara bioclimática desarrollaron infección sistémica con necrosis en nervaduras y peciolo, además de marchitez severa a los 22 dpi como las reportadas por Bag *et al.*, (2012b). En el caso de los aislamientos típicos, solo TNX1-18 desarrolló los síntomas antes descritos (considerados como severos), mientras que el resto manifestaron principalmente lesiones cloróticas y necróticas sin la afectación de venas y peciolo.

La variación de la severidad dada por condiciones de cámara bioclimática o invernadero había sido señalada por De la Torre-Almaraz *et al.*, (2002) al estudiar aislamientos de TSWV procedentes de regiones subtropicales y templadas de la región central de México (Estado de México, Puebla y Morelos); que contrastan con las zonas cálidas donde hay mayor prevalencia de este virus (Goldbach y Peters, 1994). Anteriormente, con variantes de TMV se determinó que la resistencia de la planta podría ser influenciada por la temperatura (Scholthof, 2008). Además, de manera natural el ambiente puede contribuir al incremento o

disminución de la frecuencia de poblaciones de virus (García-Arenal *et al.*, 2001). Los estudios al respecto con IYSV no especifican condiciones ambientales particulares; sin embargo, se ha relacionado la divergencia genética entre aislamientos con una adaptación a su ambiente, mostrando también diferencias en la gama de hospedantes y su respuesta (Pozzer *et al.*, 1999)

Los análisis moleculares han permitido la caracterización de variantes de virus al analizar su variabilidad genética y la función de sus genes en la patogenicidad. Zhang *et al.* (2015) estudiaron poblaciones de complejos de variantes virales y encontraron que se distribuyen de manera aleatoria dentro de las plantas con el predominio de algunos genotipos. González (2014) por su parte señala diferencias en la severidad de aislamientos de TSWV asociado a cambios en los aminoácidos de las proteínas NSm, NSs y de las regiones intergénicas (IGR) del aislamiento TSWV-L considerado como severo. Esto podría explicarse debido a la función que tiene la proteína NSs de TSWV como un supresor del silenciamiento génico (Bag *et al.*, 2012a; De Ronde *et al.*, 2013; Ocampo *et al.*, 2016).

Los primers reportados por Robène-Soustrade *et al.* (2006) utilizados en esta investigación permitieron establecer una asociación entre el tamaño del amplicón obtenido con el tipo de aislamiento (típico o severo). No obstante, se desconoce la causa de ello ya que no se encontraron cambios en la secuencia de nucleótidos del segmento S del genoma de ambos aislamientos. Al respecto, Bag *et al.* (2012b) no encontraron diferencias en la secuencia de nucleótidos del gen N entre aislamientos de IYSV que ocasionaban síntomas con distinta severidad y sugirieron la presencia de cepas del virus. El conjunto de aislamientos

que mantienen propiedades similares como el rango de hospedantes, capacidad de transmisión y similitud de secuencias de nucleótidos, entre otras, que las diferenciaban de otros grupos de aislamientos son considerados cepas virales (García-Arenal *et al.*, 2001).

Los resultados del análisis filogenético muestran que los aislamientos en estudio tienen mayor similitud con aislamientos de IYSV reportados en Norteamérica. Por otro lado, al comparar los dos aislamientos de IYSV de Morelos con los de Zacatecas se observó que los primeros se asemejan al genotipo IYSV_{BR} mientras que los segundo al genotipo IYSV_{NL}, relacionados con aislamientos de Asia y Norteamérica, respectivamente (Iftikhar *et al.*, 2014; Velásquez-Valle *et al.*, 2016). Este resultado difiere del obtenido en el árbol filogenético, al respecto Iftikhar *et al.* (2014) mencionan en su estudio que existen excepciones donde los genotipos IYSV_{BR} se agrupan con los IYSV_{NL} y viceversa; sin embargo, tales resultados podrían proporcionar información sobre el movimiento del virus entre países (Nischwitz *et al.*, 2007; Bulajić *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2006). Asimismo, en el caso de Zacatecas se reporta la presencia de islas verdes en las lesiones cloróticas (Velásquez-Valle *et al.*, 2016) mientras que en Morelos no se tiene registro de este tipo de síntoma (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016), lo cual sugiere diferencias biológicas entre los aislamientos de IYSV de ambas entidades.

Los resultados obtenidos no muestran evidencia de que los aislamientos típicos y severos de IYSV procedentes de Morelos sean variantes de este virus por lo que se sugiere se complete la secuenciación del segmento S que incluya al gen NSs así como de los segmentos L y M del genoma lo cual proporcionaría más

información de posibles diferencias entre secuencias sí como la consideración de un mayor número de especies vegetales para establecer claramente diferencias biológicas entre los aislamientos en estudio.

6. CONCLUSIÓN

Los aislamientos típicos y severos de *Iris yellow spot virus* analizados en el presente estudio tuvieron la capacidad de infectar *N. benthamiana* y desarrollar síntomas similares con diferente severidad en dos condiciones ambientales. En el análisis del gen N no se encontraron cambios de secuencia de nucleótidos entre aislamientos. Sin embargo, las diferencias en patogenicidad pueden deberse a variaciones en otras partes del genoma, tales como la proteína NSs, o los segmentos L o M.

7. LITERATURA CITADA

- Abad JA, Speck J, Mohan SK and Moyer JW. 2003. Diversity of the *Iris yellow spot virus* N gene in the USA. *Phytopathology* 93: S1. Doi: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2003.93.6.S1>.
- Aramburu J and Martí M. 2003. The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. *Plant Pathology* 52: 407. Doi: 10.1046/j.1365-3059.2003.00829.x.
- Bag S, Druffel KL, Salewsky T and Pappu HR. 2009. Nucleotide sequence and genome organization of the medium RNA of *Iris yellow spot virus* from the United States. *Archives of Virology* 154: 715–718. Doi: 10.1007/s00705-009-0349-1.
- Bag S, Mitter N, Eid S and Pappu HR. 2012a. Complementation between two tospoviruses facilitates the systemic movement of a plant virus silencing suppressor in an otherwise restrictive host. *PLoS ONE* 7: e44803. Doi: 10.1371/journal.pone.0044803.
- Bag S, Schwartz HF and Pappu HR. 2012b. Identification and characterization of biologically distinct isolates of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*), a serious pathogen of onion. *European Journal of Plant Pathology* 134: 97–104. Doi: 10.1007/s10658-012-0026-1.
- Bag S, Druffel KL and Pappu HR. 2010. Structure and genome organization of the large RNA of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). *Archives of Virology* 155: 275–279. Doi: 10.1007/s00705-009-0568-5.
- Bag S and Pappu HR. 2009. Symptomatology of *Iris yellow spot virus* in selected indicator hosts. Online. *Plant Health Progress*. Doi: 10.1094/PHP-2009-0824-01-BR.

- Birithia R, Subramanian S, Pappu HR, Sseruwagi P, Muthomi JW and Narla RD. 2011. First Report of *Iris yellow spot virus* infecting onion in Kenya and Uganda. *Plant Disease* 95: 1195. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-11-0057>.
- Bulajić A, Djekić I, Jović J, Krnjajić S, Vučurović A and Krstić B. 2009. Incidence and distribution of *Iris yellow spot virus* on onion in Serbia. *Plant Disease* 93: 976-982. Doi: [10.1094/PDIS-93-10-0976](http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-93-10-0976).
- Centre for Agricultural Bioscience International (CABI) Disponible en línea: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/28848>. (Consulta, mayo 2016)
- Córdoba-Sellés C, Martínez-Priego L, Muñoz-Gómez R and Jordá-Gutiérrez C. 2005. *Iris yellow spot virus*: A new onion disease in Spain. *Plant Disease* 89: 1243. Doi: <https://doi.org/10.1094/PD-89-1243A>.
- Cortês I, Livieratos IC, Derks A, Peters D and Kormelink R. 1998. Molecular and serological characterization of *Iris yellow spot virus*, a new and distinct tospovirus species. *Phytopathology* 88: 1276-1282. Doi: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1276>.
- Cosmi T, Marchesini E and Martini G. 2003. Presence and spread of tospovirus and thrip vectors in Veneto. *Informatore Agrario* 59: 69-72.
- Coutts BA, McMichael LA, Tesoriero L, Rodoni BC, Wilson CR, Wilson AJ, Persley DM and Jones RAC. 2003. *Iris yellow spot virus* found infecting onions in three Australian states. *Australasian Plant Pathology* 32: 555-557. Doi: [10.1071/AP03060](http://dx.doi.org/10.1071/AP03060).
- Creamer R, Sanogo S, Moya A, Romero J, Molina-Bravo R and Cramer C. 2004. *Iris yellow spot virus* on onion in New Mexico. *Plant Disease* 88: 1049. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.9.1049C>.
- Crowe FJ and Pappu HR. 2005. Outbreak of *Iris yellow spot virus* in onion seed crops in central Oregon. *Plant Disease* 89: 105. Doi: <https://doi.org/10.1094/PD-89-0105C>.

- de Ávila AC, Gama MICS, Kitajima EW and Pereira W. 1981. Um vírus do grupo vira-cabeça do tomateiro isolado de cebola (*Allium cepa* L.). *Fitopatologia Brasileira* 6: 525.
- de Haan P, Wagemakers L, Goldbach R and Peters D. 1989. Tomato-spotted wilt virus, a new member of the *Bunyaviridae*? In *Genetics and Pathogenicity of Negative Strand Viruses*, Pp. 287-291. Ed: Kolakofsky D. and Mahy B. W. J. Amsterdam: Elsevier.
- De La Torre-Almaráz R, Cervantes-Díaz L, Houston HA y Valverde R. 2002. Variación fenotípica de algunos aislamientos mexicanos del virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV). *Agrociencia* 36: 211-221. Disponible en línea: <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2002/mar-abr/art-8.pdf>.
- De Ronde D, Butterbach P, Lohuis D, Hedil M, Van Lent JWM and Kormelink R. 2013. *Tsw* gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the *Tomato spotted wilt virus*. *Molecular Plant Pathology* 14: 405–415. Doi: 10.1111/mpp.12016.
- du Toit LJ, Pappu HR, Druffel KL and Pelter GQ. 2004. *Iris yellow spot virus* in onion bulb and seed crops in Washington. *Plant Disease* 88: 222. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.222A>.
- Fichtner SM, Gent DH, Schwartz HF, Cranshaw WS, Mahaffey L and Khosla R. 2004. Geospatial relationships of *Iris yellow spot virus* and thrips to onion production in Colorado. Pp 149-151 In: *Program and Proceedings of the 2004 National Allium Research Conference*, Grand Junction, CO. Colorado State University, Fort Collins.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Disponible en línea: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S>. (Consulta, mayo 2016).

- Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DD and Brown F. 1991. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology Supplement 2: 1-450.
- García-Arenal F, Fraile A and Malpica JM. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. Annual Review of Phytopathology 39: 157–86. Doi: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.phyto.39.1.157>.
- Gent DH, du Toit LJ, Fichtner SF, Mohan SK, Pappu HR and Schwartz HF. 2006. *Iris yellow spot virus*: an emerging threat to onion bulb and seed production. Plant Disease 90: 1468-1480. Doi: 10.1094/PD-90-1468.
- Gent DH, Schwartz HF and Khosla R. 2004. Distribution and incidence of *Iris yellow spot virus* in Colorado and its relation to onion plant population and yield. Plant Disease 88: 446-452. Doi: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2004.88.5.446>.
- Gera A, Cohen J, Salomon R and Raccah B. 1998. *Iris yellow spot tospovirus* detected in onion (*Allium cepa*) in Israel. Plant Disease 82: 127-127. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.1.127B>.
- Goldbach R and Peters D. 1994. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. Seminars in Virology 5: 113-120. Doi: <https://doi.org/10.1006/smvv.1994.1012>.
- González PBE. 2014. Caracterización biológica y molecular del *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) en aislamientos mexicanos. Tesis Doctoral. Instituto de Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Disponible en línea: <http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/2271>.
- Hafez EE, El-Morsi AA, El-Shahaby OA and Abdelkhalek AA. 2014. Occurrence of *Iris yellow spot virus* from onion crops in Egypt. Virus Disease 25: 455–459. Doi: 10.1007/s13337-014-0235-7.

- Hall JM, Mohan K, Knott EA and Moyer JW. 1993. Tospoviruses associated with scape blight of onion (*Allium cepa*) seed crops in Idaho. *Plant Disease* 77: 952. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1993Articles/PlantDisease77n09_952.PDF.
- Hammon R. 2004. Managing thrips in western Colorado onions. Pp 107 *In: Program and Proceedings of the 2004 National Allium Research Conference, Grand Junction, CO. Colorado State University, Fort Collins.*
- Horne KME and Vanlandingham DL. 2014. Bunyavirus-Vector Interactions. *Viruses* 6: 4373-4397. Doi: 10.3390/v6114373.
- Huchette O, Bellamy C, Filomenko R, Pouleau B, Seddas S and Pappu HR. 2008. *Iris yellow spot virus* on shallot and onion in France. *Plant Health Progress*. Doi: 10.1094/PHP-2008-0610-01-BR.
- Iffikhar R, Bag S, Ashfaq M and Pappu HR. 2014. First report of *Iris yellow spot virus* infecting onion in Pakistan. *Plant Disease* 97: 1517. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.036>.
- Karavina C, Ibaba JD and Gubba A. 2016. First report of *Iris yellow spot virus* infecting onion in Zimbabwe. *Plant Disease* 100: 235. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0814-PDN>.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB. and Lefkowitz EJ. 2012. Family *Bunyaviridae* Pp: 725-741. *In: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. Elsevier Academic Press.*
- Kritzman A, Lampel M, Raccach B and Gera A. 2001. Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease* 85: 838-842. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.8.838>.

- Leinhos G, Müller J, Heupel M and Krauthausen HJ. 2007. *Iris yellow spot virus* an Bund- und Speisezwiebeln-erster Nachweis in Deutschland. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd 59: 310–312. Disponible en línea: https://www.journal-kulturpflanzen.de/artikel.dll/leinhos-et-al_NDg1OTQz.PDF?UID=490569013A9E5B50B7232E5B7E1141C77ADBD0AB91EA6C.
- Lewis T. 1973. Thrips: their biology, ecology and economic importance. London, Academic Press, United Kingdom. 349p.
- Lobin K, Saison A, Hostachy B, Benimadhu SP and Pappu HR. 2010. First report of *Iris yellow spot virus* in Onion in Mauritius. Plant Disease 94: 1373. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-09-0645>.
- Mandal B, Pappu HR, Csinos AS and Culbreath AK. 2006. Response of peanut, pepper, tobacco, and tomato cultivars to two biologically distinct isolates of *Tomato spotted wilt virus*. Plant Disease 90: 1150-1155. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-1150>.
- Mavric I and Ravnikar M. 2001. *Iris yellow spot Tospovirus* in Slovenia. Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology. Biodiversity in Plant Pathology, Taormina-Giardini Naxos 2000: 223-225.
- Miller ME, Saldana RR, Black MC and Pappu HR. 2006. First report of *Iris yellow spot virus* on onion (*Allium cepa*) in Texas. Plant Disease 90: 1359. Doi: <https://doi.org/10.1094/PD-90-1359B>.
- Milne RG and Francki RIB. 1984. Should tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family *Bunyaviridae*? Intervirology 22: 72-76. Doi: 10.1159/000149536.
- Mullis SW, Gitaitis RD, Nischwitz C, Csinos AS, Rafael MZC and Inguil REH. 2006. First report of onion (*Allium cepa*) naturally infected with *Iris yellow spot virus* in Peru. Plant Disease 90: 377. Doi: <https://doi.org/10.1094/PD-90-0377A>.

- Mullis SW, Langston DB Jr, Gitaitis RD, Sherwood JL and Csinos AC. 2004. First report of *Vidalia* onion (*Allium cepa*) naturally infected with *Tomato spotted wilt virus* and *Iris yellow spot virus* (family *Bunyaviridae*, genus *Tospovirus*) in Georgia. Plant Disease 88: 1285. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.11.1285B>.
- Murai T. 2004. Current status of the onion thrips, *Thrips tabaci*, as pest thrips in Japan. Agrochemicals Japan 84: 7-10.
- Nischwitz C, Pappu HR, Mullis SW, Sparks AN, Langston DR, Csinos AS and Gitaitis RD. 2007. Phylogenetic analysis of *Iris yellow spot virus* isolates from Onion (*Allium cepa*) in Georgia (USA) and Peru. Journal of Phytopathology 155: 531–535. Doi: [10.1111/j.1439-0434.2007.01272.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01272.x).
- Ocampo OT, Gabriel PSM, Bacheller N, Uiterwaal S, Knapp A, Hennen A, Ochoa-Martinez DL and Garcia-Ruiz H. 2016. Antiviral RNA silencing suppression activity of *Tomato spotted wilt virus* NSs protein. Genetics and Molecular Research 15(2): gmr.15028625. Doi: [10.4238/gmr.15028625](https://doi.org/10.4238/gmr.15028625).
- Osuna-Canizalez FJ y Ramírez-Rojas RS. 2013. Manual para cultivar cebolla con fertirriego y riego por gravedad en el estado de Morelos. SAGARPA. INIFAP. CIRPAS. Campo Experimental Zacatepec. Libro Técnico No. 12. 155 p.
- Pappu HR and Rauf A. 2013. First report of *Iris yellow spot virus* infecting green onion in Indonesia. Plant Disease 97: 1665. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0503-PDN>.
- Pappu HR and Matheron ME. 2008a. Characterization of *Iris yellow spot virus* from onion in Arizona. Online. Plant Health Progress. Doi: [10.1094/PHP-2008-0711-01-BR](https://doi.org/10.1094/PHP-2008-0711-01-BR).
- Pappu HR, Hellier BC and Dugan FM. 2006a. Wild *Allium* spp. as natural hosts of *Iris yellow spot virus*. Plant Disease 90: 378. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0378A>.

- Pappu HR, Rosales IM and Druffel KL. 2008b. Serological and molecular assays for rapid and sensitive detection of *Iris yellow spot virus* infection of bulb and seed onion crops. *Plant Disease* 92: 588-594. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-92-4-0588>.
- Pappu HR, Jones RAC and Jain RK. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141: 219–236. Doi: 10.1016/j.virusres.2009.01.009.
- Pappu HR, du Toit LJ, Schwartz HF and Mohan SK. 2006b. Sequence diversity of the nucleoprotein gene of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*) isolates from the western region of the United States. *Archives of Virology* 151: 1015–1023. Doi: 10.1007/s00705-005-0681-z.
- Pozzer L, Bezerra IC, Kormelink R, Prins M, Peters D, Resende RO and de Ávila AC. 1999. Characterization of a tospovirus isolate of *Iris yellow spot virus* associated with a disease in onion fields in Brazil. *Plant Disease* 83: 345-350. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.4.345>.
- Pozzer L, Nagata T, Lima MI, Kitajima EW, Resende RO and de Ávila AC. 1994. "Sapeca": An onion disease in the Sub-Médio São Francisco region, Brazil, is caused by a tospovirus with a serologically distinct nucleocapsid protein. *Fitopatologia Brasileira* 19: 321.
- Prins M and Goldbach R. 1998. The emerging problem of tospovirus infection and non conventional methods of control. *Trends in Microbiology* 6: 31-35. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01173-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01173-6).
- Ramírez-Rojas S, Ornelas-Ocampo K, Osuna-Canizalez FJ, Bartolo-Reyes JC, Varela-Loza V, Hernández-Romano J y Ochoa-Martínez DL. 2016. Detection of *Iris yellow spot virus* in onion plants from Tepalcingo, Morelos state, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 309-315. Doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1604-1.

- Ravi KS, Kitkaru AS and Winter S. 2006. *Iris yellow spot virus* in onions: a new tospovirus record from India. *Plant Pathology* 55: 288. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01261.x.
- Riley DG, Joseph SV, Srinivasan R and Diffie S. 2011. Thrips vectors of tospoviruses. *Journal of Integrated Pest Management* 1: 1-10. Doi: 10.1603/IPM10020.
- Robène-Soustrade I, Hostachy B, Roux-Cuvelier M, Minatchy J, Hédont M, Pallas R, Couteau A, Cassam N and Wuster G. 2006. First report of *Iris yellow spot virus* in onion bulb- and seed-production fields in Réunion Island. *Plant Pathology* 55: 288. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01262.x.
- Rosales M, Pappu HR, Lopez L, Mora R and Aljaro A. 2005. *Iris yellow spot virus* in onion in Chile. *Plant Disease* 89: 1245. Doi: <https://doi.org/10.1094/PD-89-1245C>.
- Scholthof KBG. 2008. *Tobacco Mosaic Virus*: The beginning of plant pathology. Online. *APSnet Features*. Doi: 10.1094/APSnetFeatures-2008-0408.
- Schwartz HF, Alston D, Alwang J, Bartolo M, Blunt T, Boateng CO, Bunn B, Cramer CS, Cranshaw W, Davidson J, Derie M, Doran J, Douce K, Drost D, du Toit LJ, Gao J, Gourd T, Gugino B, Hammon B, Hardin J, Hausbeck M, Jibilian G, Lafferty J, LaForest J, McMillan MS, Mohan SK, Morrice J, Nault BA, Nischwitz C, Norton G, Otto K, Pappu HR, Petersen M, Sampangi R, Schroeder B, Secor W, Szostek S, Tisserat N, Uchanski ME, VanKirk J, Waters T, Wiriyajitsomboon P and Wohleb C. 2014. Onion *ipm*PIPE: A coordinated effort to improve the management of onion thrips and *Iris yellow spot virus* for the U.S. Onion Industry. *Plant Health Progress* 15: 172-183. Doi: 10.1094/PHP-FE-14-0026.
- Schwartz HF, Brown WM Jr, Blunt T and Gent DH. 2002. *Iris yellow spot virus* on onion in Colorado. *Plant Disease* 86: 560. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.5.560D>.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Disponible en línea: <http://www.siap.gob.mx/>. (Consulta, mayo 2016).

- Sether DM, Borth WB, Shimabuku RS, Pappu HR, Melzer MJ and Hu JS. 2010. First report of *Iris yellow spot virus* in onion in Hawaii. *Plant Disease* 94: 1508. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-10-0531>.
- Shigyo M and Kik C. 2008. Handbook of plant breeding. Vegetables II. pp 121–159
In: Prohens J and Nuez F (eds). Onion. Springer. New York.
- Smith TN, Jones RAC and Wylie SJ. 2006. Genetic diversity of the nucleocapsid gene of *Iris yellow spot virus*. *Australasian Plant Pathology* 35: 359. Doi: 10.1071/AP06031.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729. Doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Tomassoli L, Tiberini A, Masenga V, Vicchi V and Turina M. 2009. Characterization of *Iris yellow spot virus* isolates from onion crops in northern Italy. *Journal of Plant Pathology* 91: 733–739. Doi: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v91i3.571>
- Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR, Salas-Muñoz S, Mauricio-Castillo JA and Pappu HR. 2016. First confirmed report of *Iris yellow spot virus* in onion nurseries in Zacatecas, Mexico. *Plant Disease* 100: 1509. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0061-PDN>.
- Vidyavati HG, Manjunatha H, Hemavathy J and Srinivasan K. 2010. Hypolipidemic and antioxidant efficacy of dehydrated onion in experimental rats. *Journal of Food Science and Technology* 47: 55–60. Doi: 10.1007/s13197-010-0015-3.
- Walter CT and Barr JN. 2011. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *Journal of General Virology* 92: 2467–2484. Doi: 10.1099/vir.0.035105-0.
- Ward LI, Perez-Egusquiza Z, Fletcher JD, Ochoa CFM, Tang JZ, Liefting LW, Martin EJ, Quinn BD, Pappu HR and Clover GRG. 2008. First report of *Iris yellow spot*

virus on *Allium cepa* in New Zealand. New Disease Reports. Doi:
<http://www.bspp.org.uk/ndr/july2008/2008-43.asp>.

Whitfield AE, Falk BW and Rotenberg D. 2015. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479-480: 278–289. Doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>.

Zamboni A, Pierantoni L and De Franceschi P. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody plants. *iForest-Biogeosciences and Forestry* 1: 122-125. Doi: 10.3832/ifor0465-0010122.

Zhang XF, Guo J, Zhang X, Meulia T, Paul P, Madden LV, Li D and Qu F. 2015. Random plant viral variants attain temporal advantages during systemic infections and in turn resist other variants of the same virus. *Scientific Reports Nature* 5: 15346. Doi: 10.1038/srep15346.