



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**VIRUS EN CULTIVOS DE CEBOLLA
ASOCIADOS A ARVENSES DE
MORELOS Y MICHOACÁN**

NORMA ÁVILA ALISTAC

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

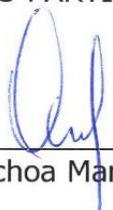
2017

La presente tesis titulada: **Virus en cultivos de cebolla asociados a arvenses de Morelos y Michoacán**, realizada por el la alumna: **Norma Ávila Alistac**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

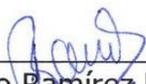
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Daniel L. Ochoa Martínez

ASESOR



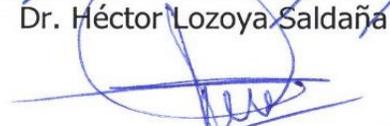
Dr. Sergio Ramírez Rojas

ASESOR



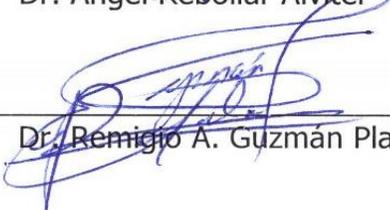
Dr. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR



Dr. Ángel Rebolgar Alviter

ASESOR



Dr. Remigio A. Guzmán Plazola

Montecillo, Texcoco, Estado de México, marzo de 2017

VIRUS EN CULTIVOS DE CEBOLLA ASOCIADOS A ARVENSES DE MORELOS Y MICHOACÁN

Norma Ávila Alistac Dra.
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

Las arvenses son uno de los principales problemas en la agricultura especialmente en cultivos hortícolas como la cebolla (*Allium cepa* L.). Muchas arvenses son hospedantes alternos de virus de importancia agrícola. Los objetivos de la presente investigación fue detectar hospederos alternos de *Onion yellow dwarf virus*-OYDV, *Leek yellow stripe virus*-LYSV, *Tomato spotted wilt virus*-TSWV, *Groundnut bud necrosis virus*-GBNV y/o *Iris yellow spot virus*-IYSV en zonas productoras de cebolla en el estado de Morelos y Michoacán, e identificar los hospedantes alternos del putativo vector de IYSV. Se realizaron muestreos de plantas de cebolla y arvenses en 10 localidades en ambos estados, en presencia y ausencia del cultivo de la cebolla. Las plantas de cebolla se analizaron por RT-PCR y las arvenses por DAS-ELISA. Con los trips detectados en las arvenses se establecieron colonias en condiciones de laboratorio para su identificación por PCR COI. Se analizaron e identificaron un total de 190 muestras (29 especies de Morelos y 18 de Michoacán) de arvenses para los virus OYDV, LYSV, TSWV y GBNV. *Tithonia diversifolia* y *Amaranthus hybridus* colectadas de Michoacán fueron positivos para OYDV. *Salvia gracilis* y *Chenopodium murale* de Michoacán y *A. hybridus*, *A. spinosus* y *Portulaca oleraceae* colectadas de Morelos fueron positivos para LYSV. Solo *A. hybridus*, *C. murale* y *A. spinosus* mostraron síntomas, el resto de las plantas positivas para los virus, fueron asintomáticas. Ninguna planta resultó positiva para TSWV y GBNV. Para el caso de IYSV, se analizaron e identificaron 295 arvenses agrupadas en 56 especies. Ninguna arvense resultó positiva para el virus, pero se detectaron en 75 arvenses (17 especies de arvenses) poblaciones de trips, de las cuales se analizaron 33 colonias (22 de Morelos y 11 de Michoacán) con una homología en sus secuencias superior a 97% para *Thrips tabaci*. En *Ricinus communis* and *Acalypha ostryifolia* se encontraron con mayor número de *T. tabaci*. Se confirmó la presencia de IYSV por RT-PCR en las 10 parcelas de cebolla muestreadas. Este es el primer reporte de IYSV en el cultivo de la cebolla en el estado de Michoacán.

Palabras clave: Arvenses, *Thrips tabaci*, IYSV, OYDV, LYSV.

VIRUSES IN ONION CROPS ASSOCIATED TO ARVENSES OF MORELOS AND MICHOACÁN

Norma Ávila Alistac Dra.
Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Weeds are one of the main problems for agriculture especially on horticultural crops such as onion (*Allium cepa* L.). Several species of weeds are alternate hosts of viruses of agricultural importance. The main goal of this research was to detect alternate hosts of *Onion yellow dwarf virus*-OYDV, *Leek yellow stripe virus*-LYSV, *Tomato spotted wilt virus*-TSWV, *Groundnut bud necrosis virus*-GBNV and / or *Iris yellow spot virus*-IYSV in producing regions of onion in the state of Morelos and Michoacan, as well as to identify alternate hosts of the putative vector of IYSV. Onion and weeds were sampled in 10 locations in both states, in the presence and absence of the crop. Onion plants were analyzed by RT-PCR and weeds by DAS-ELISA. Thrips found on weeds were collected and colonies were established under laboratory conditions for identification by COI PCR. A total of 190 samples (29 species from Morelos and 18 from Michoacan) were identified and tested for OYDV, LYSV, TSWV and GBNV viruses. *Tithonia diversifolia* and *Amaranthus hybridus* from Michoacan were positive for OYDV. *Salvia gracilis* and *Chenopodium murale* from Michoacan and *A. hybridus*, *A. spinosus* and *Portulaca oleraceae* from Morelos were positive for LYSV. Only *A. hybridus*, *C. murale* and *A. spinosus* showed symptoms, the rest of plants positive for viruses, were asymptomatic. No weed was positive for TSWV and GBNV. In the case of IYSV, 295 weeds were identified in 56 species and tested for this virus. No weeds were positive for IYSV, but thrips were detected in 75 weeds (17 species of weeds), and 33 colonies were obtained (22 from Morelos and 11 from Michoacan) and their sequences were analyzed resulting in a homology greater than 97% for *Thrips tabaci*. *Ricinus communis* and *Acalypha ostryifolia* were found with high number of *T. Tabaci*. The presence of IYSV on onion was confirmed by RT-PCR on all the sampled plot in both states. To the best of our knowledge this is the first report of IYSV affecting onion in Michoacan state.

Keywords: Weeds, *Thrips tabaci*, IYSV, OYDV, LYSV.

A Dios

A mi pequeño gran amor Juan Sebastián

A mis padres Martha Elena y Martín

A mis hermanos Martín y Santiago

A mi abuelita Eulalia[†] y mi tío Alejandro

Y finalmente a Tí...

AGRADECIMIENTOS

Al departamento de Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Fideicomiso No. 167304 otorgado por la Investigación científica y desarrollo tecnológico del Colegio de Postgraduados. Parte fundamental para financiar mis estudios e investigación.

Al Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez, agradezco infinitamente su paciencia y apoyo durante mi estancia en la institución. Así como sus consejos y orientación brindados en momentos importantes.

A mi consejo particular: Dr. Sergio Ramírez Rojas, Dr. Héctor Lozoya Saldaña, Dr. Ángel Rebollar Alviter y Dr. Remigio A. Guzmán Plazola, por su colaboración, apoyo y orientación en este trabajo, así como sus consejos y recomendaciones. Gracias.

Mis más sinceros agradecimientos a los doctores del departamento de Fitosanidad, en especial al Dr. Cristian Nava Díaz, Dr. Gustavo Mora Aguilera y el Dr. Refugio Lomeli Flores. Por su gran apoyo, consejos, atenciones y motivación durante mi estancia doctoral en el Colegio de Postgraduados.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Virus Fitopatógenos, Katya, Tania, Erika, Noemí, Paty, Don Ricardo y Osmar, por todos esos momentos compartidos fuera y dentro del laboratorio.

A mis amigos de antaño y los que hice en mi estancia doctoral, que siempre me han apoyado y motivado en cada etapa de mi vida, Angélica Jiménez, Edgar Olvera, Oscar, Mercedes, Camilo, María, Katya, Francisco, Gerardo Acevedo, Juan y Mabe. Si bien algunos de ustedes los vi poco y a otros frecuentemente, siempre me motivaron y apoyaron, los quiero. Y a todos aquellos que de forma directa o indirecta me apoyaron en la realización de esta tesis y por su tiempo compartido.

A ti, que llegaste a darle un sabor peculiar a la vida y una huella indeleble, donde te encuentres mil gracias.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1 Generalidades de la cebolla	1
1.2 Enfermedades virales en cebolla	3
1.2.1 Mancha blanca	3
1.2.2 Enanismo amarillo.....	6
1.2.3 Rayado amarillo	7
1.2.4 Manchado clorótico	8
1.2.5 Mosaico.....	10
1.4 LITERATURA CITADA.....	15
CAPITULO II. PRESENCIA DE TRIPS E IDENTIFICACIÓN DE IYSV EN ARVENSES ASOCIADAS AL CULTIVO DE CEBOLLA	27
2.1 RESUMEN	27
2.2 INTRODUCCIÓN	28
2.3 OBJETIVO.....	31
2.3.1 Objetivo general	31
2.3.2 Objetivos específicos	31

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.4.1 Selección de sitios de muestreo	32
2.4.2 Colecta de plantas de cebolla	32
2.4.3 Detección de IYSV en plantas de cebolla	33
Extracción RNA total y RT-PCR	33
2.4.4 Colecta e identificación de arvenses	34
2.4.5 Presencia de trips de las arvenses.....	35
2.4.6 Detección de IYSV en arvenses.....	36
2.4.7 Identificación molecular de especies de trips	36
Extracción de ADN	36
PCR de los trips	37
2.4.8 Análisis de las secuencias de trips.....	38
2.5 RESULTADOS	39
2.5.1 Detección de IYSV en cebolla.....	39
2.5.2 Colecta e identificación de arvenses	41
2.5.3 Presencia de trips.....	45
2.5.4 Detección de IYSV en arvenses.....	47
2.5.5 Identificación molecular de especies de trips	47
PCR de los trips	47
2.5.6 Análisis de las secuencias de trips.....	48
2.6 DISCUSIÓN	51
2.7 CONCLUSIONES.....	57
2.8 LITERATURA CITADA.....	58
CAPITULO III. VIRUS ASOCIADOS A ARVENSES EN CULTIVOS DE CEBOLLA DE MORELOS Y MICHOACÁN	66

3.1 RESUMEN	66
3.2 INTRODUCCIÓN	67
3.3 OBJETIVO.....	68
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	68
3.4.2 Detección de virus en arvenses	69
3.4.3 Extracción de ARN total, síntesis de cDNA y amplificación por PCR.....	69
Extracción de ARN total	69
Síntesis de cDNA y amplificación por PCR	69
3.5 RESULTADOS	71
3.5.1 Colecta e identificación de arvenses	71
3.5.2 Detección de virus en arvenses	74
3.5.3 Extracción de RNA total, síntesis de cDNA y amplificación por PCR.....	76
3.6 DISCUSIÓN	77
3.7 CONCLUSIÓN	80
3.8 LITERATURA CITADA.....	81

LISTA DE CUADROS

I. REVISIÓN DE LITERATURA

Cuadro 1. Virus asociados al cultivo de la cebolla.....	2
Cuadro 2. Hospedantes alternos de <i>Iris yellow spot virus</i>	5

II. PRESENCIA DE TRIPS E IDENTIFICACIÓN DE IYSV EN ARVENSES ASOCIADAS AL CULTIVO DE CEBOLLA

Cuadro 1. Especies de arvenses trips, ubicación, época de colecta y análisis por DAS-ELISA para detectar la presencia de IYSV en los estados de Morelos y Michoacán.....	41
Cuadro 2. Colonias de trips colectadas en diferentes especies de arvenses e identificadas por PCR COI, en las regiones productoras de cebolla de los estados de Morelos y Michoacán.....	62

III. VIRUS ASOCIADOS A ARVENSES EN CULTIVOS DE CEBOLLA DE MORELOS Y MICHOACÁN

Cuadro 1. Arvenses colectadas en presencia y ausencia del cultivo de cebolla en Morelos y Michoacán y resultado de la prueba de DAS-ELISA para <i>Leek yellow stripe virus</i> (LYSV), <i>Onion yellow dwarf virus</i> OYDV, <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) y <i>Groundnut bud necrosis virus</i> (GBNV).....	83
---	----

LISTA DE FIGURAS

I. REVISIÓN DE LITERATURA

- Figura 1.** Síntomas en hojas de cebolla asociados con: a) hongos; b) bacterias; c) *Iris yellow spot virus* consistentes en lesiones alargadas color pajizo con presencia de islas verdes en el centro o d) ausencia de islas verdes en la lesión..... 4

II. PRESENCIA DE TRIPS E IDENTIFICACIÓN DE IYSV EN ARVENSES ASOCIADAS AL CULTIVO DE CEBOLLA

- Figura 1.** Criterios de selección de plantas de cebolla en campo con síntomas característicos del *Iris yellow spot virus* de acuerdo con reportes de los síntomas inducidos por el virus..... 33
- Figura 2.** Esquemmatización de la colecta de trips de plantas arvenses y formación de colonias en frascos con ejotes..... 36
- Figura 3.** Síntomas de IYSV en plantas de cebolla: a) síntomas iniciales y avanzados de IYSV en forma alargada de color pajizo-cloróticas, localizados en el estado de Morelos y b) síntomas iniciales en forma alargada con presencia de una isla verde en el centro de la mancha y coalición de los síntomas, localizados en el estado de Michoacán..... 39
- Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa a 1 % de RT-PCR de IYSV en muestras de cebolla de Morelos y Michoacán. M: marcador molecular de 100 pb (Promega®); carril: 1 y 2: plantas de Vista Hermosa, Mich.; carril 3-6: plantas de Tanhuato, Mich.; carril 7 y 8: Xochitepec, Mor.; carril 9 y 10: Puente de Ixtla, Mor.; carril 11: Zacatepec, Mor.; carril (-): Testigo negativo (Agua); carril (+): Planta de cebolla positiva..... 40
- Figura 5.** Muestras de cebolla con síntomas asociados a IYSV, las cuales se les realizó RT-PCR. a y b) Vista Hermosa, Mich. c-f) Tanhuato, Mich. g-h) Atlacholoaya, Mor. i-j) Puente de Ixtla, Mor. k)

Zacatepec, Mor. Muestras: a, i plantas negativas para IYSV por RT-PCR.....	40
Figura 6. Distribución de frecuencias del total de especies de arvenses analizadas para IYSV por DAS-ELISA en el estado de Morelos y Michoacán.....	44
Figura 7. Frecuencia de trips inmaduros y/o adultos en arvenses, en presencia y ausencia del cultivo de la cebolla en Morelos y Michoacán.....	45
Figura 8. Principales arvenses hospederas de <i>T. tabaci</i> en los estados de Morelos y Michoacán: a) <i>P. oleracea</i> , b) <i>A. ostryifolia</i> , c) <i>A. cristata</i> , d) <i>T. tubiformis</i> , e) <i>M. parviflora</i> , f) <i>I. purpurea</i> , g) <i>L. virginicum</i> , h) <i>A. hybridus</i> , i) <i>R. comunis</i> , j) <i>S. oleraceus</i> y k) <i>P. hysterothorus</i>	46
Figura 9. Arvenses colectadas con síntomas sospechosos de virosis y plantas asintomáticas para el análisis de <i>Iris yellow spot virus</i> por DAS-ELISA, en los estados de Michoacán y Morelos, México.....	47
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa a 1 % de PCR de muestras de trips obtenidas de arvenses. M: marcador molecular de 100 pb (Promega®); 27-38: DNA de trips obtenidas de diversas especies de arvenses de Morelos y Michoacán.....	48
Figura 11. Árbol filogenético de secuencias de nucleótidos de <i>T. tabaci</i> y secuencias obtenidas de GenBank cuyos números de accesiones se especifica por UPGMA.....	50

III. VIRUS ASOCIADOS A ARVENSES EN CULTIVOS DE CEBOLLA DE MORELOS Y MICHOACÁN

Figura 1. Distribución de frecuencias de especies de arvenses analizadas para los virus OYDV, LYSV, TSWV y GBNV por DAS-ELISA en los estados de Morelos y Michoacán.....	73
Figura 2. Muestras de arvenses del estado de Michoacán positivas para <i>Onion yellow dwarf virus</i>	74

Figura 3. Especies de arvenses positivas para LYSV por DAS-ELISA en los estados de Morelos y Michoacán.....	75
Figura 4. Síntomas de las arvenses positivas para <i>Leek yellow spot virus</i> por DAS-ELISA colectadas del estado de Morelos y Michoacán.....	76
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la RT-PCR del género <i>Potyvirus</i> en arvenses. M: marcador molecular de 1 Kb; carril 1: Control negativo (agua); carriles 2-4: <i>A. hybridus</i> ; carril 5: <i>A. spinosus</i> ; carril 6: <i>P. oleracea</i> y carril 7: Control positivo para <i>Potyvirus</i> de 1.7 Kb.....	77

CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Generalidades de la cebolla

La cebolla (*Allium cepa* L.) se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo, considerando el centro de origen las zonas de Afganistán, Irán y Paquistán (Astey *et al.*, 1982); o bien, la región del Mediterráneo (Hill, 2008). La importancia de esta planta radica en el uso de los bulbos en la alimentación humana en sus numerosas formas (Raymond, 2009).

Los principales países productores de cebolla son China, India, Estados Unidos de América, Turquía e Irán. La mayor producción se concentra en Asia con el 60 % (FAOSTAT, 2016). En México durante el año 2015 se sembraron 50,848.33 ha, de las cuales el 60 % se concentró en los estados de Guanajuato, Baja California, Chihuahua, Tamaulipas y Puebla; mientras que en Michoacán y Morelos se concentró el 16 % de la superficie cultivada (4,683 y 2,531 ha, respectivamente) (SIAP, 2016).

Este cultivo se ve afectado por diferentes patógenos como hongos, bacterias, nematodos y virus de los géneros *Potyvirus*, *Carlavirus* y *Allexivirus* (Lunello *et al.*, 2007), algunos de los cuales pueden llegar a limitar la producción y calidad del bulbo (Sevik, 2012). En el mundo se mencionan alrededor de 18 virus afectando el cultivo, y solo seis especies de los géneros *Potyvirus*, *Tospovirus* y *Carlavirus* se han registrado en México (Cuadro 1).

Cuadro 1. Virus asociados al cultivo de la cebolla.

Virus	Acrónimo	Género	Referencias
Virus enanismo amarillo de la cebolla (<i>Onion yellow dwarf virus</i>)*	OYDV	<i>Potyvirus</i>	(Horst, 2008; Brewster, 2008; Magos, 2011)
Virus rayado amarillo del puerro (<i>Leek yellow stripe virus</i>)*	LYSV	<i>Potyvirus</i>	(Shahraeen, et al., 2008; Brewster, 2008; Magos, 2011; Velasquez-Valle et al., 2010; Pérez-Moreno et al., 2004)
Virus rayado amarillo del shallot (<i>Shallot yellow stripe virus</i>)	SYSV	<i>Potyvirus</i>	(Brewster, 2008)
Virus latente del shallot (<i>Shallot latent virus</i>)	SLV	<i>Carlavirus</i>	(Shahraeen, et al., 2008; Brewster, 2008)
Virus de la marchitez manchada del tomate (<i>Tomato spotted wilt virus</i>)*	TSWV	<i>Tospovirus</i>	(Stanković et al., 2012; Velasquez-Valle et al., 2010)
Virus del jaspeado del tabaco (<i>Tobacco etch virus</i>)*	TEV	<i>Potyvirus</i>	(Velasquez-Valle et al., 2010)
Virus X del shallot (<i>Shallot virus X</i>)	SVX	<i>Allexivirus</i>	(Brewster, 2008)
Virus de la mancha amarilla del iris (<i>Iris yellow spot virus</i>)*	IYSV	<i>Tospovirus</i>	(Shahraeen, et al., 2008; Gent, 2004; Bulajić et al., 2009; Rafizadeh et al., 2012; Pappu et al., 2008; Sudeep et al., 2012; Brewster, 2008; Velásquez-Valle y Reveles-Hernández; 2011; Magos, 2011)
Virus latente común del ajo (<i>Garlic latent common virus</i>)*	GarCLV	<i>Carlavirus</i>	(Shahraeen, et al., 2008; Magos, 2011; Velasquez-Valle et al., 2010)
Virus de la mancha anular amarillo de la alcachofa (<i>Artichoke yellow ringspot virus</i>)	AYRSV	<i>Nepovirus</i>	(Maliogka et al, 2006)
Virus C del ajo (<i>Garlic virus C</i>)	GarV-C	<i>Carlavirus</i>	(Shahraeen et al., 2008; Ward et al., 2009)
Virus D del ajo (<i>Garlic virus D</i>)	GarV-D	<i>Carlavirus</i>	(Shahraeen et al., 2008; Ward et al., 2009)
Virus A del ajo (<i>Garlic virus A</i>)	GarV-A	<i>Allexivirus</i>	(Ward et al., 2009)
Virus B del ajo (<i>Garlic virus B</i>)	GarV-B	<i>Allexivirus</i>	(Ward et al., 2009)
Virus de la necrosis del brote del cacahuete (<i>Groundnut bud necrosis virus</i>)	GBNV	<i>Tospovirus</i>	(Sujitha et al., 2012)
Virus cascabeleo del tabaco (<i>Tobacco rattle virus</i>)	TRV	<i>Tobravirus</i>	(Hamed et al., 2012)
Virus latente transmitido por ácaros en cebolla (<i>Onion mite-borne latent virus</i>)	OMbLV	<i>Allexivirus</i>	(Van Dijk et al., 1991)

(*) Virus presentes en México

1.2 Enfermedades virales en cebolla

1.2.1 Mancha blanca

Es una enfermedad de importancia económica en el cultivo de la cebolla (Jones, 2005; Bag *et al.*, 2009) y otros cultivos del género *Allium* (Bag *et al.*, 2015; Weilner y Bedlan, 2013) ya que puede generar pérdidas en producción de semilla y reducción del tamaño del bulbo (Bag *et al.*, 2010; Bag *et al.*, 2012). Es causada por *Iris yellow spot virus* (IYSV, virus de la mancha amarilla del iris) familia *Bunyaviridae*, género *Tospovirus*. Su genoma consta de tres segmentos de RNA: S (2.9 kb), M (4.8 kb) y L (8.9 kb) (Cortês *et al.*, 1998). El RNA L codifica la ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRp) en sentido negativo (Bag *et al.*, 2010), el ARN M codifica la proteína de movimiento NSm en sentido positivo y las glicoproteínas Gn y Gc en sentido negativo (Bag *et al.*, 2009). El ARN S codifica para la proteína NSs en sentido positivo y la proteína de la nucleocápside (N) (Cortês *et al.*, 1998).

Los síntomas causados en cebolla suelen ser muy característicos (Weilner y Bedlan, 2013), consistentes en lesiones elongadas o en forma de huso, cloróticas o de color café a blanco y con presencia o ausencia de una isla verde en el centro de la lesión (Figuras 1c y 1d) (Gent *et al.*, 2006). Al principio de la infección los síntomas pueden confundirse con lesiones ocasionadas por trips u otros patógenos como hongos o bacterias (Figuras 1a y 1b) (Weilner y Bedlan, 2013). En la mayoría de los casos las lesiones se observan en la parte interna de las hojas más próximas al bulbo, donde los trips tienen preferencia en alimentarse. Al unirse las lesiones, las hojas colapsan

reduciendo el área fotosintética (Kritzman *et al.*, 2001) lo cual afecta la formación del bulbo (Gent *et al.*, 2006) e incluso la muerte en la planta cuando el daño es severo (Weilner y Bedlan 2013). En *Nicotiana benthaminana*, se ha reportado que causa deformación sistémica en hojas y mosaico (Ghotbi *et al.*, 2005). Los síntomas son más frecuentes cuando la planta tiene una edad avanzada o en la formación del bulbo (Weilner y Bedlan, 2013).

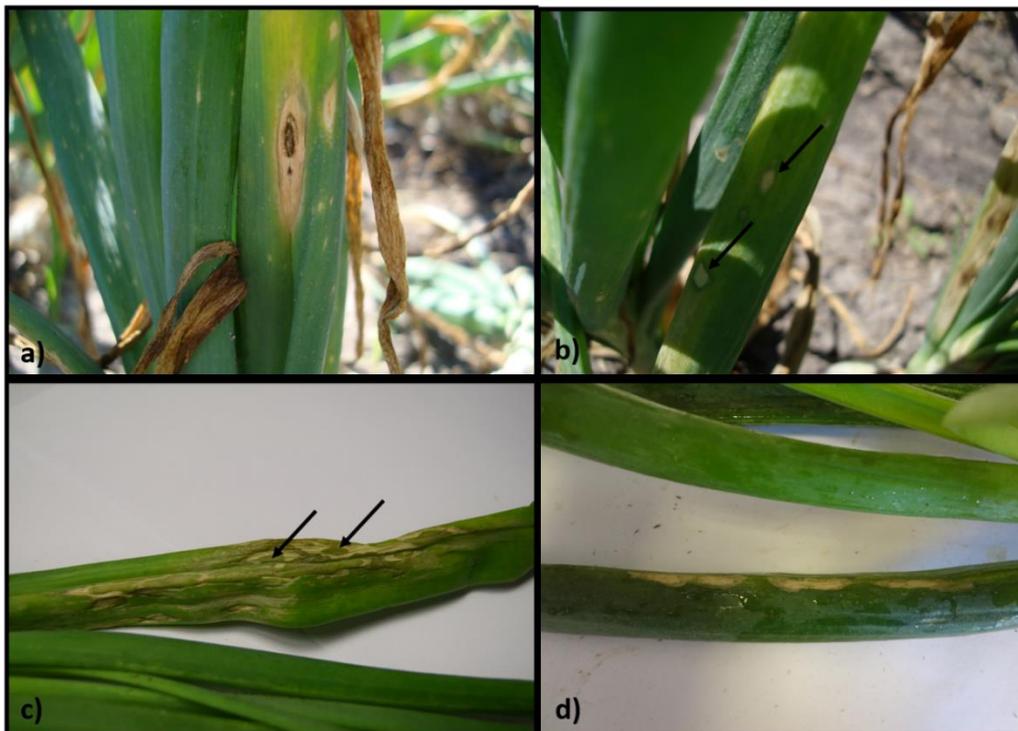


Figura 1. Síntomas en hojas de cebolla asociados con: a) hongos; b) bacterias; c) *Iris yellow spot virus* consistentes en lesiones alargadas color pajizo con presencia de islas verdes en el centro o d) ausencia de islas verdes en la lesión.

Se pensaba que IYSV tenía una limitada gama de hospedantes (Kritzman *et al.*, 2001); no obstante, en los últimos años el virus se ha detectado en forma natural en varias plantas ornamentales (Jones, 2005), cultivos y arvenses (Hsu *et al.*, 2011;

Sampangi *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2014; Weilner y Bedlan, 2013; Szostek y Schwartz, 2015) en todo el mundo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Hospedantes alternos de *Iris yellow spot virus*.

Nombre común	Familia	Nombre científico	Referencias
Amaranto	Amaranthaceae	<i>Amaranthus retroflexus</i> <i>A. hybridus</i> <i>A. spinosus</i>	(Gent <i>et al.</i> , 2006; Sampangi <i>et al.</i> , 2007; Schwartz <i>et al.</i> , 2014) (Karavina y Gubba, 2017) (Karavina y Gubba, 2017)
Lampazo menor	Asteraceae	<i>Arctium minus</i> <i>Artemisia vulgaris</i> <i>Arctium tomentosum</i>	(Hsu <i>et al.</i> , 2011; Smith <i>et al.</i> , 2012) (Weilner y Bedlan 2013)
Achicoria común	Asteraceae	<i>Cichorium intybus</i>	(Hsu <i>et al.</i> , 2011; Smith <i>et al.</i> , 2012; Weilner y Bedlan 2013)
Lengua de vaca	Polygonaceae	<i>Rumex crispus</i>	(Hsu <i>et al.</i> , 2011; Smith <i>et al.</i> , 2012; Weilner y Bedlan 2013)
Diente de león	Asteraceae	<i>Taraxicum officinale</i>	(Hsu <i>et al.</i> , 2011; Smith <i>et al.</i> , 2012; Schwartz <i>et al.</i> , 2014; Szostek y Schwartz, 2015)
Verdolaga	Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i>	(Cosmi <i>et al.</i> , 2003; Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Almorejo	Poaceae	<i>Setaria viridis</i>	(Evans <i>et al.</i> , 2009b)
Atriplex	Amaranthaceae	<i>Atriplex micrantha</i> (sin. <i>A. heterosperma</i>)	(Evans <i>et al.</i> , 2009a)
Lechuguilla espinosa	Asteraceae	<i>Sonchus asper</i>	(Nischwitz <i>et al.</i> , 2007)
Abrojo de flor amarilla	Zygophyllaceae	<i>Tribulus terrestris</i>	(Sampangi <i>et al.</i> , 2007)
Coquia	Chenopodiaceae	<i>Kochia scoparia</i>	(Sampangi <i>et al.</i> , 2007; Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Lechuga silvestre	Asteraceae	<i>Lactuca serriola</i>	(Sampangi <i>et al.</i> , 2007; Schwartz <i>et al.</i> , 2014; Szostek y Schwartz, 2015)
Quinoa	Chenopodiaceae	<i>Chenopodium album</i>	(Sampangi <i>et al.</i> , 2007; Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
	Brassicaceae	<i>Chorispora tenella</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Correhuela	Convolvulaceae	<i>Convolvulus arvensis</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014; Weilner y Bedlan 2013)
	Brassicaceae	<i>Descurainia sophia</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014; Szostek y Schwartz, 2015)
Lechuguilla común	Asteraceae	<i>Sonchus oleraceus</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Hierba mora	Solanaceae	<i>Solanum nigrum</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Llantén de hoja angosta	Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Higuerilla	Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Senecio	Asteraceae	<i>Senecio vulgaris</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Chamisa	Asteraceae	<i>Chrysothamnus nauseosus</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Hairy Nightshade	Solanaceae	<i>Solanum sarrachoides</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Pendiente	Asteraceae	<i>Conyza canadensis</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Zacate cara de cabra	Poaceae	<i>Aegilops cylindrica</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
polígono pata perdis	Polygonaceae	<i>Polygonum lapathifolium</i> ,	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)

Alfilerillo	Geraniaceae	<i>Erodium cicutarium</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Bola de fuego	Amaranthaceae	<i>Salsola iberica</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Lechosilla	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia dentata</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Flor de una hora	Malvaceae	<i>Hibiscus trionum.</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
	Brassicaceae	<i>Brassica kaber</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014)
Barbaja amarilla	Asteraceae	<i>Tragopogon dubius</i>	(Schwartz <i>et al.</i> , 2014; Szostek y Schwartz, 2015)
Arete	Amaryllidaceae	<i>Bessera elegans</i>	(CABI, 2015)
	Plantaginaceae	<i>Linaria canadensis</i>	(CABI, 2015)
		<i>Tripleurospermum inodorum</i>	(Weilner y Bedlan 2013)
		<i>Dactylis glomerata</i>	(Weilner y Bedlan 2013)
		<i>Poa sp.</i>	(Weilner y Bedlan 2013)
		<i>Malva neglecta</i>	(Szostek y Schwartz, 2015)
Pata de gallina	Poaceae = Gramineae	<i>Capsella bursapastoris</i>	(Weilner y Bedlan 2013)
		<i>Eleusine indica</i>	(Karavina y Gubba, 2017)

El virus no se transmite por semilla (Kritzman *et al.*, 2001), pero sí de forma mecánica y por trips, principalmente *Thrips tabaci* (Cortês *et al.*, 1998), además de *Frankliniella fusca* pero en un bajo porcentaje de transmisión bajo condiciones de laboratorio (Srinivasan *et al.*, 2012).

1.2.2 Enanismo amarillo

Es una enfermedad de importancia económica en cebolla y ajo por las pérdidas que ocasiona (Arya *et al.*, 2006), las cuales pueden ser superiores a 70 % en este último cultivo (Lot *et al.*, 1998). Es causada por el *Onion yellow dwarf virus* (OYDV, virus del enanismo amarillo de la cebolla) mismo que puede estar presente en infecciones mixtas con otros virus (Arya *et al.*, 2006) como el *Leek yellow spot virus* (LYSV) y *Shallot yellow stripe virus* (SYSV), complejo que en conjunto puede ocasionar pérdidas superiores a 88 % en ajo (Lot *et al.*, 1998). El OYDV pertenece a la familia *Potyviridae* (género *Potyvirus*), posee partículas filamentosas flexibles de 772 a 823 nm de largo. Su genoma es de ARN monocatenario de 10 kb que codifica una poliproteína (Sastry y Zitter, 2014).

El virus ocasiona rayas amarillas e irregulares en hojas jóvenes, mientras que las hojas maduras presentan amarillamiento y deformación (Arya *et al.*, 2006) que pueden provocar reducción del tamaño del bulbo (Davis y Aegerter, 2010). Asimismo, los bulbos infectados se deforman y generalmente presentan susceptibilidad ante infecciones de parásitos facultativos en almacén (Sastry y Zitter, 2014), además de tener mayor dormancia que los bulbos de plantas sanas lo cual se refleja en pérdidas que alcanzan el 60 % (Brewster, 2008). Si bien el virus se puede localizar en el bulbo, la mayor concentración se tiene en hojas (Sevik, 2012).

El OYDV está limitado a especies del género *Allium* como cebolla, ajo, chalota y algunas ornamentales (Davis y Aegerter, 2010) y es transmitido por diversas especies de áfidos como *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *A. craccivora* y *Acyrtosiphon pisum* (El-Wahab, 2009; Kumar *et al.*, 2009). Este virus no se transmite por semilla y su diseminación ocurre por plantas infectadas, permaneciendo en plantas voluntarias (Davis y Aegerter, 2010). También se puede transmitir mecánicamente con una eficiencia superior a 60 % en plantas de cebolla (Kumar *et al.*, 2009).

1.2.3 Rayado amarillo

Esta enfermedad afecta a varias especies del género *Allium*, principalmente ajo (Testen *et al.*, 2014) ocasionando pérdidas que varían de 50 a 60 % (Lot *et al.*, 1998; Brewster, 2008), dependiendo de las condiciones climáticas o las variedades utilizadas. Es causada por el *Leek yellow stripe virus* (LYSV, virus del rayado amarillo del puerro) y puede ocasionar pérdidas superiores a 90 % en ajo si se encuentra presente también el

OYDV (Lot *et al.*, 1998). El LYSV pertenece al género *Potyvirus* y posee partículas flexibles de aproximadamente 700 nm de largo (Mohamed *et al.*, 1980).

En hojas de puerro (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) causa rayas amarillas irregulares discontinuas y flacidez, lo que ocasiona que las hojas se contraigan (Brewster, 2008). Los síntomas son evidentes en hojas jóvenes (Davis y Aegerter, 2010), pero también en hojas intermedias y maduras (Lot *et al.*, 1998). Las plantas infectadas reducen su resistencia ante heladas y el bulbo reduce su vida en postcosecha (Brewster, 2008). En ajo ocasiona rayado clorótico, muerte foliar, achaparramiento y reducción del tamaño de los bulbos (Testen *et al.*, 2014).

Experimentalmente puede causar lesiones locales cloróticas en *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa*. Su principal vector es *Myzus persicae*, pero también lo pueden transmitir *Rhopalosiphum maidis*, *R. padi*, *Schizaphis graminum*, *Aphis gossypii*, *A. nerii*, *Uroleucon sonchi*, *Hyperomyzus carduellinus* (Lunello *et al.*, 2002), *Aphis craccivora* y *Acyrtosiphon pisum* (El-Wahab, 2009).

1.2.4 Manchado clorótico

Esta enfermedad es causada por *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, virus de la marchitez manchada del jitomate) el cual tiene una distribución mundial y ocasiona daños considerables en varios cultivos de importancia económica (Sastry, 2013). El TSWV tiene una amplia gama de hospedantes, superior a 925 especies mono y dicotiledóneas pertenecientes a 70 familias (Chatzivassiliou *et al.*, 2002; Sastry, 2013). Pese a su amplia

distribución se tiene escasa información de su presencia en especies del género *Allium* (Stanković *et al.*, 2012).

El virus pertenece al género *Tospovirus* (familia *Bunyaviridae*), presenta viriones cuasi esféricos de 80-120 nm de diámetro, posee genoma tripartita de ARN monocatenario: el segmento L es de sentido negativo mientras que los segmentos M y S tienen orientación ambisentido. El ARN L tiene 8.9 kb y codifica la replicasa viral. El segmento M de 4.8 kb codifica en sentido positivo a la proteína no estructural NSm y a las glicoproteínas Gn/Gc en sentido negativo. El segmento S es de 2.9 kb y codifica en sentido positivo a la proteína no estructural NSs y la proteína de la nucleocápside en sentido negativo (Tsompana y Moyer, 2010).

Los síntomas causados por TSWV en plantas de cebolla consisten en pequeñas manchas cloróticas y blanquecinas, mientras que en plantas de ajo son estriados y manchas cloróticas (Stanković *et al.*, 2012). La incidencia de plantas con síntomas generada por la infección de este virus puede ser superior a 60 % en cebolla y 40 % en ajo, asociado con altas poblaciones de *Thrips tabaci* (Stanković *et al.*, 2012).

Diferentes especies de trips son vectores del virus, entre las que se encuentran *Thrips tabaci*, *T. setosus*, *Frankliniella schultzei*, *F. fusca*, *F. intonsa*, *F. bispinosa*, *F. gemina* y *F. cephalica*, siendo *F. occidentalis* su principal vector (Riley *et al.*, 2011). Aunque también se considera un buen transmisor a *T. tabaci* (Chatzivassiliou *et al.*, 2002).

1.2.5 Mosaico

Es causada por el *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV, virus de la yema necrótica del cacahuate) también conocido como *Peanut bud necrosis virus* (PBNV) (Singh *et al.*, 2014). El virus se reportó por primera vez en India en 1949 en plantas de cacahuate y en el sur, así como en el sureste de Asia causando daños superiores a 50 % (Revadi *et al.*, 2014). En 2012 se reportó por primera vez en India en plantaciones de cebolla (Sujitha *et al.*, 2012).

El GBNV pertenece a la familia *Bunyaviridae* género *Tospovirus* y tiene partículas cuasi esféricas de 80-120 nm de diámetro (Sujitha *et al.*, 2012) y genoma ARN monocatenario tripartita. El ARN S es ambisentido, tiene 3057 nucleótidos y dos ORFs separados por una región intergénica rica en A+U. Un ORF (1320 nucleótidos) codifica la proteína no estructural (NSs) en sentido positivo y el segundo (831 nucleótidos) a la proteína de la nucleocápside (N) en sentido negativo (Satyanarayana *et al.*, 1996a). El ARN M posee 4801 nucleótidos con dos ORFs (de 924 y 3363 nucleótidos, respectivamente) que codifican dos proteínas: los precursores de las glicoproteínas G1 y G2 en sentido negativo y la proteína no estructural (NSm) en sentido positivo (Satyanarayana *et al.*, 1996b). Finalmente, el ARN L de 8911 nucleótidos codifica la replicasa viral de 330 kDa en sentido negativo (Gowda *et al.*, 1998).

Los síntomas ocasionados por el GBNV varían de acuerdo al cultivo y pueden ser moteado, necrosis en yemas, venas y hojas (Akhter *et al.*, 2012), mosaicos severos y anillos cloróticos (Reddy *et al.*, 2011). En cebolla provoca una coloración pajiza en hojas,

mosaico y lesiones necróticas en hojas jóvenes. La infección inicia con una necrosis en la parte apical de la hoja y tallos de las inflorescencias, seguido por el aborto de las flores y finalmente muerte de la planta (Sujitha *et al.*, 2012). El GBNV tiene una amplia gama de hospedantes que incluyen cultivos como cacahuete, papa, jitomate, chile y diversas legumbres (Mandal *et al.*, 2012), dentro de las familias Araceae, Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae y Tiliaceae (CABI, 2015). El virus es transmitido por diferentes especies de trips entre las que se encuentran *Thrips palmi*, *Frankliniella schultzei* y *Scirtothrips dorsalis* (Mandal *et al.*, 2012); además puede transmitirse de forma mecánica (Akram *et al.*, 2013).

1.3 Trips

Los trips (Terebrantia: Thripidae), son insectos polívoros que se alimentan de la savia de la planta (Alford, 1999) y varias especies son vectoras o transmisoras de virus de los géneros *Tospovirus*, *Illavirus*, *Carmovirus* y *Machlomovirus* (Jones, 2005). Las especies vectoras del género *Tospovirus* incluyen seis especies de *Frankliniella*, tres de *Thrips* y una de los géneros *Ceratothripoides* y *Scirtothrips* (Jones, 2005). Estos insectos presentan dos tipos de reproducción: telitoquia (reproducción por patogénesis) y arrenotoquia (reproducción sexual) (Jacobson *et al.*, 2013).

Thrips tabaci conocido comúnmente como trips de la cebolla, es una plaga importante en este cultivo (Diaz-Montano *et al.*, 2011), además de que puede alimentarse de un gran número de plantas (Schoonhoven *et al.*, 2005) como pepino, puerro y jitomate por mencionar algunas hortalizas (Alford, 1999), al igual que algunas plantas ornamentales (Gent *et al.*, 2004). *T. tabaci* es bien conocido por transmitir de forma

eficiente a TSWV en el cultivo de tabaco, jitomate, chile y plantas ornamentales en Europa (Jenser *et al.* 2011); de igual manera transmite a *Tomato varamin virus* (ToVV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (Ghotbi *et al.*, 2005) e *Iris yellow spot virus* (Gent *et al.*, 2004).

Los trips tienen seis estados de vida: huevo, dos instares larvales (larva I y larva II), dos instares de pupa (prepupa y pupa) y adulto (Jones, 2005; Pourian *et al.*, 2009). Los huevos de forma reniforme son puestos bajo la epidermis de las hojas en un lapso de 1-22 semanas. Las larvas emergen y se alimentan por un periodo de dos semanas y después entran al suelo para completar su desarrollo. Una semana después emergen los adultos (Alford, 1999), los cuales miden en promedio 0.9 mm de largo con una coloración que varía de amarillo a café claro a oscuro (Pourian *et al.*, 2009). Solo la larva I, larva II y adulto se alimentan del tejido de la planta, mientras que la prepupa y la pupa se mantienen sin alimentarse (Pourian *et al.*, 2009). Bajo condiciones climáticas propicias, los trips pueden tener un ciclo de 20 días desde huevo a adulto (Jones, 2005). Aunado a ello, la temperatura influye en la eficiencia de transmisión del virus por el vector (Chatzivassiliou *et al.*, 2002) y se sabe que las condiciones secas y cálidas favorecen el desarrollo de extensas poblaciones de trips (Alford, 1999).

La alimentación en el follaje de estos insectos produce daños directos como manchas cloróticas y enchinamiento en hojas (Alford, 1999), senescencia prematura, deformación en bulbos y yemas, decoloración en flores, así como disminución del tamaño de la planta (Sastry, 2013). Tanto los estados inmaduros como los adultos

perforan las células con su estilete y succionan su contenido (Jones, 2005). Solo la larva I y II adquieren al virus al momento de alimentarse y la larva II y los adultos lo transmiten (Sastry, 2013); si el virus se adquiere en estado adulto, éste no lo puede transmitir (Jones, 2005; Whitfield *et al.*, 2005). Una vez que el virus es adquirido por el insecto, éste se reproduce y se mueve eficientemente por el intestino medio y las glándulas salivales de los trips. Así mismo, se han localizado altas concentraciones de la proteína N dentro del insecto en estado inmaduro y adulto (Inoue *et al.*, 2010). Esta capacidad de adquirir el virus lo tienen las larvas y se decrementa conforme avanza su edad (Hull, 2001; Chatzivassiliou *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha comprobado que la infección del vector por el virus no afecta su desarrollo, fecundidad y mortalidad (Inoue *et al.*, 2010).

Las plantas hospederas de los trips incluyen no solo cultivos de importancia económica, sino diversas arvenses que al fenecer o ser eliminadas favorecen la dispersión de los insectos al cultivo de interés (Doederlein y Sites, 1993). Consecuentemente, la presencia de trips virulíferos en estas plantas puede favorecer la dispersión de virus (Ghotbi *et al.*, 2005). En la agricultura es importante conocer las especies de plagas que se tienen; sin embargo, en muchas ocasiones su identificación basada en su morfología es difícil (Kobayashi y Hasegawa, 2012), entre otras cosas porque la mayoría de las claves existentes consideran sólo adultos y muy pocas se basan en estados inmaduros (Glover *et al.*, 2010).

En años recientes ha tomado importancia el uso de técnicas moleculares para la identificación de especies de insectos. De hecho, en *T. tabaci* se han realizado estudios basados en sus secuencias de DNA mitocondrial (Kobayashi y Hasegawa, 2012).

Asimismo, el uso del gen citocromo oxidasa I (COI) proporciona suficiente información para discriminar especies a nivel de género (Glover *et al.*, 2010). En estos estudios no solo se pueden discriminar genéticamente especies, también es posible conocer si se trata de un linaje sexual o asexual procedente de un área geográficamente igual, dependiendo de las condiciones climáticas, cultivo y población (Kobayashi *et al.*, 2013).

1.4 LITERATURA CITADA

- Akhter M. S., S. K. Holkar, A. M. Akanda, B. Mandal and R. K. Rain. 2012. First report of *Groundnut bud necrosis virus* in tomato in Bangladesh. *Plant Disease* 96 (6): 917.
- Akram M., Naimuddin, A. Pratap, N. Malviya and P. Yadav. 2013. First report of *Groundnut bud necrosis virus* infecting wild species of *Vigna*, based on NP gene sequence characteristics. *Phytopathologia Mediterranea*. 52 (3): 532-540.
- Arya M., V. K. Baranwal, Y. S. Ahlawat and L. Singh. 2006. RT-PCR detection and molecular characterization of *Onion yellow dwarf virus* associated with garlic and onion. *Current Science*. 91(9):1-5.
- Astey, D., N. L. Innes, and Q. P. van der Meer. 1982. Genetic Resources of *Allium* Species. Global report International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 8 p.
- Bag S., H. F. Schwartz and H. R. Pappu. 2012. 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 (1): 97-104.
- Bag S., H. F. Schwartz, C. S. Cramer, M. J. Havey and H. R. Pappu. 2015. *Iris yellow spot virus* (*Tospovirus*: Bunyaviridae): from obscurity to research priority. *Molecular Plant Pathology*. 224-237.

- Bag S., K. L. Druffel and H. R. Pappu. 2010. Structure and genome organization of the large RNA of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family Bunyaviridae). Archives of Virology. 155 (2): 275-279.
- Bag S., K. L. Druffel, T. Salewsky and H. R. Pappu. 2009. Nucleotide sequence and genome organization of the medium RNA of *Iris yellow spot virus* from the United States. Archives of Virology. 154 (4): 715-718.
- Brewster J. L. 2008. Onion and other vegetable *Allium*. 2nd edition. Series Crop Protection science in horticulture: 15. CAB International. 204 p.
- Bulajić, A., I. Djekić, J. Jović, S. Krnjajić, A. Vučurović, and B. Krstić. 2009. Incidence and distribution of *Iris yellow spot virus* on onion in Serbia. Plant Disease. 93:976-982.
- CABI, 2015. *Groundnut bud necrosis virus*. Crop Protection Compendium. (Consultado: junio, 2014): <http://www.cabi.org/cpc/datasheet/6188>.
- Chatzivassiliou, E. K., D. Peters and N. I. Katis. 2002. The efficiency by which *Thrips tabaci* populations transmit *Tomato spotted wilt virus* depends on their host preference and reproductive strategy. Phytopathology. 92(6): 603-609.
- Cortês I., I. C. Livieratos, A. Derks, D. Peters and R. Kormelink. 1998. Molecular and serological characterization of *Iris yellow spot virus*, a new and distinct *Tospovirus* species. Phytopathology. 88 (12): 1276-1282.
- Cosmi, T., E. Marchesini, and G. Martini. 2003. Presence and spread of *Tospovirus* and thrips vectors in Veneto. Infomatore Agrario 59:69-72.

- Davis R. M., and B. J. Aegerter. 2010. Pest management guidelines: Onion/Garlic. IPM, Pest Management Guidelines. University of California Agriculture and Natural Resources. Oakland, CA. pp 12-26.
- Diaz-Montano J., M. Fuchs, B. A. Nault, J. Fail and A. M. Shelton. 2011. Onion Thrips (Thysanoptera: Thripidae): A Global Pest of Increasing Concern in Onion. Journal of Economic Entomology. 104 (1): 1-13.
- Doederlein T. A. and R. W. Sites. 1993. Host plant preferences of *Frankliniella occidentalis* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) for onions and associated weeds on the Southern High Plains. Journal of Economic Entomology. 86 (6): 1706-1713.
- El-Wahab A. S. A. 2009. Aphid-transmission efficiency of two main viruses on garlic in Egypt, *Onion yellow dwarf virus* (OYDV-G) and *Leek yellow stripe virus* (LYSV-G). Academic Journal of Entomology. 2 (1): 40-42.
- Evans, C. K., S. Bag, E. Frank, J. R. Reeve, C. Ransom, D. Drost and H. R. Pappu. 2009a. Natural infection of *Iris yellow spot virus* in two scale saltbush (*Atriplex micrantha*) growing in Utah. Plant disease. 93(4): 430.
- Evans C. K., Bag S., Frank E., Reeve J., Ransom C., Drost D. and H. R. Pappu. 2009b. Green foxtail (*Setaria viridis*), a naturally infected grass host of *Iris yellow spot virus* in Utah. Plant Disease. 93 (6): 670.

FAOSTAT, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Disponible: <http://faostat3.fao.org/home/E>. Consultado: Julio de 2016.

Gent D. H., H. F. Schwartz, and R. Khosla. 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.

Gent D. H., L. J. du Toit, S. F. Fichtner, S. K. Mohan, H. R. Pappu and H. F. Schwartz. 2006. *Iris yellow spot virus*: An emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Disease*. 90 (12): 1468-1480.

Ghotbi T., N. Shahraeen and S. Winter. 2005. Special report occurrence of Tospoviruses in ornamental and weed species in Markazi and Tehran provinces in Iran. *Plant Disease*. 89: 425-429.

Glover R. H., D. W. Collins, K. Walsh and N. Boonham. 2010. Assessment of loci for DNA barcoding in the genus *Thrips* (Thysanoptera: Thripidae). *Molecular Ecology Resources*. 10: 51-59.

Gowda S., T. Satyanarayana, R. A. Naidu, A. Mushegian, W. O. Dawson and D. V. Reddy. 1998. Characterization of the large (L) RNA of *Peanut bud necrosis tospovirus*. *Archives of Virology*. 143 (12): 2381-2390.

Hamed, A. H., O. M. El-Banna, G. A. M. Ghanem, H. Elnagaar and M. S. Shafie. 2012. Isolation and identification of *Tobacco rattle tobnavirus* affecting onion (*Allium cepa* L.) plants in Egypt. *International Journal of Virology*. 8(1): 39-49.

- Hill D., S. 2008. Pest of crops in warmer climates and their control. Springer. Science & Business Media. United Kingdom. Pp. 602.
- Horst R. K. 2008. Westcott's plant disease Handbook. 7th edition. Springer. New York. 644 p.
- Hsu C. L., C. A. Hoepfing, M. Fuchs, E. A. Smith and B. A. Nault. 2011. Sources of *Iris yellow spot virus* in New York. *Plant Disease*. 95: 735-743.
- Inoue T., T. Murai and T. Natsuaki. 2010. An effective system for detecting *Iris yellow spot virus* transmission by *Thrips tabaci*. *Plant Pathology*. 59: 422-428.
- Jacobson A. L., W. Booth, E. L. Vargo and G. G. Kennedy. 2013. *Thrips tabaci* population genetic structure and polyploidy in relation to competency as a vector of *Tomato spotted wilt virus*. *PloS ONE*. 8(1): e54484.
- Jenser G., A. Almási, J. Fail and I. Tobiás. 2011. Differences in the vector efficiency of *Thrips tabaci* in Europe and North America. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 46(2): 311-317.
- Jones, D. R. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology*. 113: 119-157.
- Karavina C. and Gubba A. 2017. *Amaranthus* sp. and *Eleusine indica* are natural host of *Iris yellow spot virus* in Zimbabwe. *Plant Disease*. 101 (1): 262.

- Kobayashi K. and E. Hasegawa. 2012. Discrimination of reproductive forms of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) by PCR with sequence specific primers. *Journal of Economic Entomology*. 105 (2): 555-559.
- Kobayashi K., J. Yoshimura and E. Hasegawa. 2013. Coexistence of sexual individuals and genetically isolated asexual counterparts in a thrips. *Scientific Reports*. 3: 3286.
- Kritzman A., M. Lampel, B. Raccach and A. Gera. 2001. Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease*. 85:838-842.
- Kumar P., R. Mehra and P. Dhawan. 2009. Biological and serological diagnosis of *Onion yellow dwarf virus*. *Journal Horticultural Science*. 38 (3&4): 300-305.
- Lot H., V. Chovelon, S. Souche and B. Delecolle. 1998. Effects of *Onion yellow dwarf* and *Leek yellow stripe viruses* on symptomatology and yield loss of three french garlic cultivars. *Plant Disease*. 82: 1381-1385.
- Lunello P., D. A. Ducasse, M. Helguera, S. F. Nome and V. C. Conci. 2002. An argentinean isolate of *Leek yellow stripe virus* from leek can be transmitted to garlic. *Journal of Plant Pathology*. 84 (1): 11-17.
- Lunello P., J. Di Rienzo and V. C. Conci. 2007. Yield loss in garlic caused by *Leek yellow stripe virus* Argentinean isolate. *Plant Disease*. 91: 153-158.
- Magos G., K. 2011. Trips y virus asociados a cebolla (*Allium cepa* L.), su efecto en el rendimiento en Atlacholoaya, Morelos. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 67 p.

- Maliogka V. I., C. I. Dovas, D. E. Lesemann, S. Winter, and N. I. Katis. 2006. Molecular identification, reverse transcription-polymerase chain reaction detection, host reactions, and specific cytopathology of *Artichoke yellow ringspot virus* infecting onion crops. *Phytopathology*, 96: 622-629.
- Mandal B., R. K. Jain, M. Krishnareddy, N. K. Krishna Kumar, K. S. Ravi and H. R. Pappu. 2012. Emerging problems for *Tospoviruses* (Bunyaviridae) and their management in the Indian Subcontinent. *Plant Disease*. 96(4): 468-479.
- Mohamed N. A. and B. R. Young. 1980. *Leek yellow stripe virus* in New Zealand. *Journal of Agricultural Research*. 23: 129-131.
- Nischwitz C., R. D. Gitaitis, S.W. Mullis, A. S. Csinos, D. B. Langston, and A. N. Sparks. 2007. First report of *Iris yellow spot virus* in spiny sowthistle (*Sonchus asper*) in the United States. *Plant Disease*. 91:1518.
- Pappu H. R., I. M. Rosales, and K. L. Druffel. 2008. 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.
- Pérez-Moreno L., E. Rico-Jaramillo, J. R. Sánchez-Palé, J. T. Ascencio-Ibáñez, R. Díaz-Plaza y R. F. Rivera-Bustamante. 2004. Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22: 187-197.

- Pourian H. R., M. Mirab-balou, M. Alizadeh and S. Orosz. 2009. Study on biology of onions thrips, *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber (Var. Sultan) in laboratory conditions. *Journal of Plant Protection Research*. 49(4): 390-394.
- Rafizadeh N., B. Jafarpour, M. N. Isfahani and M. F. Rastegar. 2012. Molecular and serological studies of *Iris yellow spot* virus in onion plants in Iran. *Agricultural Journal*. 7 (3): 180-186.
- Raymond A. T. G. 2009. Vegetable seed production. 3rd edition. Cab International. London, U. K. pp. 251- 252.
- Reddy, B. B. V., Y. Sivaprasad and D. V. R. Sai Gopal. 2011. First report of *Groundnut bud necrosis virus* on *Calotropis gigantea*. *Journal of Plant Pathology*. 93 (4): S4.84.
- Revadi M., A. Srinivasaraghavan, and G. Sunkad. 2014. *Peanut bud necrosis disease*. The American Phytopathological Society. Disponible en: <http://www.apsnet.org/publications/imageresources/Pages/fi00223.aspx>
- Riley D. G., S. V. Joseph, R. Srinivasan, S. Diffie. 2011. Thrips vectors of Tospoviruses. *Journal of Integrated Pest Management*. 1(2): 1-10.
- Sampanji R. K. and S. K. Mohan. 2007. Identification of new alternative weed hosts for *Iris yellow spot virus* in the Pacific Northwest. *Pant Disease*. 91(12): 1683.
- Satyanarayana T., S. E. Mitchell, D. V. Reddy, S. Brown, S. Kresovich, R. Jarret, R. A. Naidu and J. W. Demski. 1996a. *Peanut bud necrosis tospovirus* S RNA: complete

nucleotide sequence, genome organization and homology to other *tosspoviruses*. Archives of Virology. 141 (1): 85-98.

Satyanarayana T., S. E. Mitchell, D. V. Reddy, S. Kresovich, R. Jarret, R. A. Naidu, S. Gowda and J. W. Demski. 1996b. The complete nucleotide sequence and genome organization of the M RNA segment of *Peanut bud necrosis tospovirus* and comparison with other tospoviruses. Journal of General Virology. 77(9): 2347-2352.

Sastry K. S. 2013. Plant virus and viroid diseases in the tropics. Volume 1: Introduction of plant viruses and sub-viral agents, classification, assessment of loss, transmission and diagnosis. Springer Science & Business Media. New York, NY. 361 p.

Sastry S. K. and T. A. Zitter. 2014. Plant virus and viroid diseases in the tropics. Volume 2: Epidemiology and management. Springer Science & Business Media. New York, NY. 489 p.

Schoonhoven L. M., J. J. A. van Loon, M. Dicke. 2005. Insect-Plant biology. 2nd edition. Oxford University. New York, NY. Pp: 1-24.

Schwartz H. F., D. H. Gent, S. M. Fichtner, K. Otto, C. O. Boateng, S. Szostek, W. S. Cranshaw and L. A. Mahaffey. 2014. *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) and *Iris yellow spot virus* associated with onion transplants, onion volunteers, and weeds in Colorado. Southwestern Entomologist. 39(4): 691-704.

- Sevik M. A. 2012. Determination of *Onion yellow dwarf virus* concentration levels on onion bulb and leaf by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 45 (3): 339-343.
- Shahraeen N., D. E. Lesemann and T. Ghotbi. 2008. Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in Iran. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 38: 131–135.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Consultado en diciembre 2016. Disponible: <http://www.siap.gob.mx/>.
- Singh P., S. S. Indi and H. S. Savithri. 2014. *Groundnut bud necrosis virus* encoded NSm associates with membranes via its C-terminal domain. *PLoS ONE*. 9(6): e99370.
- Smith E. A., A. DiTommaso, M. Fuchs, A. M. Shelton and B. A. Nault. 2012. Abundance of weed hosts as potential sources of onion and potato viruses in western New York. *Crop Protection*. 37: 91-96.
- Srinivasan R., S. Sundaraj, H. R. Pappu, S. Diffie, D. G. Riley and R. D. Gitaitis. 2012. Transmission of *Iris yellow spot virus* by *Frankliniella fusca* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology*. 105(1): 40-47.
- Stanković I., A. Bulajić, A. Vučurović, D. Ristić, K. Milojević, D. Kicolić and B. Krstić. 2012. First Report of *Tomato spotted wilt virus* infecting onion and garlic in Serbia. *Plant Disease*. 96(6): 918.
- Sudeep B., H. F. Schwartz and H. R. Pappu. 2012. 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.
- Sujitha A., B. V. B. Reddy, Y. Sivaprasad, R. Usha and D. V. R. Sai Gopal. 2012. First report of *Groundnut bud necrosis virus* infecting onion (*Allium cepa*). *Australasian Plant Disease Notes*. 7: 183-187.
- Szostek A.S. and H. F. Schwartz. 2015. Overwintering sites of *Iris yellow spot virus* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in Colorado. *Southwestern Entomologist*. 40(2): 273–290.
- Testen A. L., D. P. Mamiro, T. Meulia, N. Subedi, M. Islam, F. Baysal-Gurel and S. A. Miller. 2014. First report of *Leek yellow stripe virus* in garlic in Ohio. *Plant Disease*. 98 (4): 574.
- Van Dijk P., M. Verbeek and L. Bos. 1991. Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species, and their classification into two new rymoviruses in the familiy *Potyviridae*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 97: 381-399.
- Velásquez-Valle R. y Reveles-Hernández M. 2011. Detección del *Iris yellow spot virus* en el cultivo de cebolla en Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2(6): 971-978.
- Ward L. I., Z. Perez-Egusquiza, J. D. Fletcher and G. R. G. Clover. 2009. A survey of viraldiseases of *Allium* crops in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*. 38: 533-539.

Weilner S. and G. Bedlan. 2013. Detection of *Iris yellow spot virus* (IYSV) in selected *Allium* species and overwintering hosts in Austrian onion-producing areas. *Journal fur Kulturflanzen*. 65(2): 60-67.

Whitfield A. E., D. E. Ullman and T. L. German. 2005. *Tospovirus*-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 459-489.

CAPITULO II. PRESENCIA DE TRIPS E IDENTIFICACIÓN DE IYSV EN ARVENSES ASOCIADAS AL CULTIVO DE CEBOLLA

2.1 RESUMEN

Las arvenses juegan un papel importante al ser hospederos alternos de patógenos y/o insectos que pueden afectar a la cebolla. El objetivo de este trabajo fue detectar hospederos alternantes del *Iris yellow spot virus*-IYSV y/o del putativo vector en Morelos y Michoacán en el cultivo de la cebolla. Las arvenses fueron muestreados en diez parcelas de Morelos y Michoacán durante los años 2014-2016 en presencia y ausencia del cultivo de cebolla para detectar IYSV. Las muestras de cebolla se analizaron por RT-PCR y las arvenses por DAS-ELISA con antisueros específicos para el virus e identificación por PCR COI para trips colectadas de las arvenses. Las plantas de cebolla colectadas en 10 parcelas de ambos estados fueron positivas para IYSV por RT-PCR. Todas las muestras de arvenses resultaron negativas para IYSV por DAS-ELISA. Se detectaron trips en 75 arvenses. Treinta y tres de las poblaciones de trips fueron identificadas como *T. tabaci* superior al 97 % de identidad. *Ricinus communis* y *Acalypha ostryifolia* mostraron ser los más importantes reservorios de *T. tabaci*. Esta información muestra el potencial de las plantas no cultivadas como reservorios de *T. tabaci* que al ser vector de IYSV puede desempeñar un papel muy importante en la epidemia de la enfermedad en el cultivo de la cebolla de Morelos y Michoacán.

Palabras clave adicionales: DAS-ELISA, *T. tabaci*, PCR COI, *Ricinus communis*, *Acalypha ostryifolia*.

2.2 INTRODUCCIÓN

La cebolla es un cultivo de importancia económica en México. Sin embargo, es afectado por varias enfermedades, las ocasionadas por virus han originado gran interés por su difícil control. El virus de la mancha amarilla del iris (*Iris yellow spot virus*, *Tospovirus*) es uno de los virus más devastadores del género *Allium* (Brewster, 2008) y posee una amplia distribución geográfica y un extenso rango de hospedantes (Smith *et al.*, 2011; Ghotbi *et al.*, 2005; Sampangi y Mohan, 2007). El virus se transmite por trips (Terebrantia: Thripidae) particularmente *Thrips tabaci* Lineman, conocido como trips de la cebolla que ocasiona la enfermedad mancha blanca en el cultivo. No obstante, Srinivasan *et al.* (2012) también reportan a *Frankiniella fusca* con capacidad de adquirir el virus pero con menor capacidad.

El virus de la mancha blanca (IYSV), al igual que los virus del mismo género necesitan la interacción de tres elementos básicos para causar una epidemia: el vector, el hospedante del vector y el virus (Ullman *et al.*, 2002). Aunado a ello, las condiciones ambientales puede condicionar la epidemia en un área determinada (German *et al.*, 1992). Estos virus tienen la capacidad de utilizar al vector para infectar nuevos hospedantes, ampliando su adaptabilidad al portar el virus; influyendo en su incidencia y distribución bajo diferentes condiciones ambientales y nuevos hospedantes (Jones, 2005).

Los insectos vectores poseen un amplio rango de hospedantes, teniendo a las arvenses como reservorio primario especialmente en ausencia del cultivo. Estas arvenses son frecuentes dentro y fuera de las plantaciones constituyendo la principal causa de prevalencia de los insectos en un área determinada (Gent *et al.*, 2006). Así mismo, la importancia que tienen algunas arvenses por su amplia distribución en el mundo (Tanveer *et al.*, 2015) favorece la prevalencia de los vectores. Por otro lado, si están presentes en todo el año permiten que el vector se desarrolle continuamente ocasionando su perpetuación (Chatzivassiliou *et al.*, 2007). En el caso particular de los trips, la abundancia de las arvenses también se asocia con la diversidad de especies de estos insectos en las parcelas (Atakan y Uygur, 2005).

Los hospederos alternos son fundamentales en la epidemiología del IYSV, sobre todo si *T. tabaci* puede completar su desarrollo en dichas plantas (Hsu *et al.*, 2011). Por lo anterior, el manejo de los hospederos alternos que se encuentran dentro o alrededor del cultivo son determinantes para el control de la enfermedad en un patosistema (Schwartz *et al.*, 2014; Wisler y Norris, 2005).

Esto aumenta el interés en realizar estudios sobre el insecto, el virus, hospedante principal (cebolla) y alternos (arvenses). Estas interacciones tienden a ser muy complejas. Rodríguez *et al.* (2007) enfatizan la importancia de tener un amplio conocimiento de esta relación para optimizar el manejo de la enfermedad. Dichos tipo de interacciones puede afectar en el surgimiento de nuevas variantes del virus, gama de hospedantes y/o frecuencia de transmisión (Syller, 2012). Así mismo, la capacidad que

tienen los trips para desarrollarse en otras plantas no cultivadas favorece este tipo de interacción, ya que la ausencia del principal hospedante incentiva la migración de los trips a otras partes vegetativas o inflorescencias de otras plantas (Milne y Walter, 1998).

Mundialmente se ha estudiado la importancia de hospedantes alternos y vectores secundarios (Schoonhoven *et al.*, 2005). En México, solo se tiene registro de la presencia de IYSV en cebolla en los estados de Morelos (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016) y Zacatecas (Velásquez-Valle y Reveles-Hernández, 2011), y en el cultivo de ajo en Guanajuato (Pérez-Moreno *et al.*, 2010) donde reportan también la presencia del vector. Por otro lado, en el caso de hospederos alternos, en México se tiene poca información respecto a IYSV en arvenses, así como la sobrevivencia del putativo vector en arvenses ante la ausencia del principal hospedante: la cebolla. Ante dichos antecedentes, la presente investigación tuvo el propósito de conocer posibles hospederos alternos del IYSV y establecer un rango de hospedantes del putativo vector en dos entidades productoras de cebolla: Morelos, donde el virus está ampliamente distribuido y Michoacán, donde no se tiene reporte de su presencia.

2.3 OBJETIVO

2.3.1 Objetivo general

- Detectar hospederos alternos del *Iris yellow spot virus*-IYSV y/o del putativo vector en regiones productoras de cebolla de los estados de Morelos y Michoacán.

2.3.2 Objetivos específicos

- Establecer rango de hospedantes del putativo vector e identificar las especies por PCR COI.
- Identificar hospederos alternos de IYSV por DAS-ELISA.
- Detectar la presencia de *Iris yellow spot virus* en el cultivo de cebolla en ambos estados.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Selección de sitios de muestreo

Se seleccionaron un total de 10 parcelas destinadas al cultivo de cebolla en los municipios de Puente de Ixtla, Ayala, Axochiapan y Emiliano Zapata (Morelos), y en Vista Hermosa y Tanhuato (Michoacán). La selección de parcelas se realizó en base a la disponibilidad de plantaciones de cebolla en el momento del primer muestreo. Los muestreos se realizaron en los meses de diciembre 2014 (Morelos), enero (Morelos y Michoacán), julio (Morelos), octubre de 2015 (Morelos y Michoacán) y enero de 2016 (Morelos y Michoacán) en presencia y ausencia del cultivo.

2.4.2 Colecta de plantas de cebolla

Con la finalidad de confirmar la presencia del virus en las localidades, se tomaron muestras de plantas completas de cebolla en las mismas parcelas donde se realizó la colecta de arvenses. El muestreo fue dirigido a plantas (cinco plantas) con síntomas típicos del IYSV, considerando la presencia de lesiones cloróticas o blancas alargadas y con presencia o ausencia de una isla verde en el centro (Figura 1) (Gent *et al.*, 2006; Weilner y Bedlan, 2013). Los muestreos se realizaron desde finales del 2014 a inicio del año 2016. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C dentro de bolsas de plástico previamente etiquetadas para su posterior análisis.

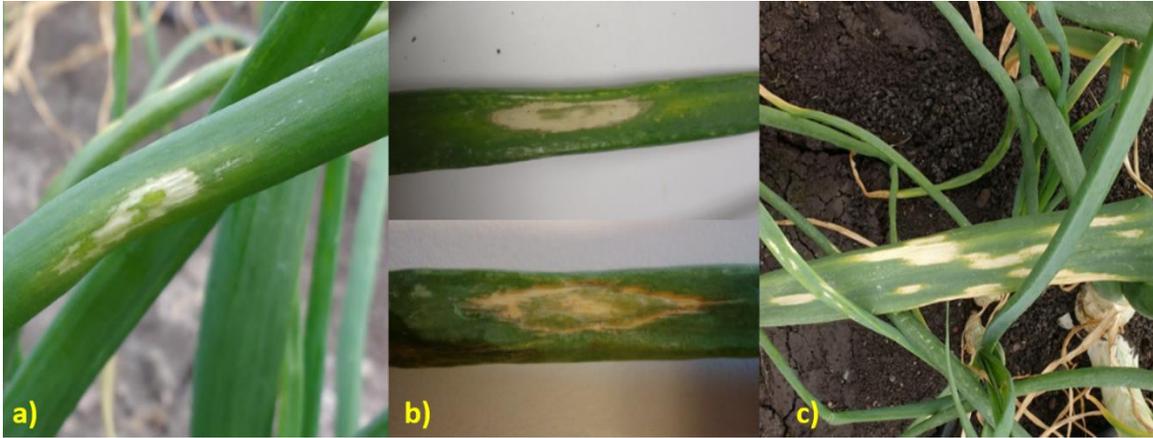


Figura 1. Criterios de selección de plantas de cebolla en campo con síntomas característicos del *Iris yellow spot virus* de acuerdo con reportes de los síntomas inducidos por el virus.

2.4.3 Detección de IYSV en plantas de cebolla

Extracción ARN total y RT-PCR

De las plantas de cebolla con síntomas se les realizó extracción de ARN total con el método de TRIzol® Reagent de acuerdo con las instrucciones del fabricante (life technologies™). Posterior a ello, se llevó a cabo la técnica de reverso-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con iniciadores específicos que amplifica una banda de 750 pb del gen, que codifica para la proteína de la nucleocápside del virus: IYSV-For (TGG YGG AGA TGY RGA TGT GGT) e IYSV-Rev (ATT YTT GGG TTT AGA AGA CTC ACC) (du Toit *et al.*, 2007).

Para la síntesis de cDNA se utilizó 0.6-1.0 µg de ARN, 0.5 µL (10 mM) de cada iniciador específico del virus y 4 µL de agua en un tiempo de incubación de 72 °C por 10 min. Después, se realizó la segunda mezcla en un volumen final de 20 µL: buffer M-MLV (Promega®), DTT (DL-Dithiothreitol), dNTP's (10 µL) (Promega®) y la enzima reversa

transcriptasa M-MLV (Promega®). La mezcla se incubó a 37 °C por 60 min y posteriormente a 70 °C por 10 min.

El volumen final para la PCR fue de 25 µL: 2.5 µL de buffer PCR 5X, 1.25 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL dNTP's (10 mM), 0.5 µL por iniciador (10 mM), 0.5 µL de Taq polimerasa (5U/µL) y 2 µL de cDNA, con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min, seguidos por 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 51 °C por 30 s y 68 °C por 1 min y una extensión final de 68 °C por 7 min. El producto de amplificación obtenido (750 pb) se visualizó en un fotodocumentador mediante electroforesis en un gel de agarosa a 1 % teñido previamente con bromuro de etidio. De los productos amplificados, se purificaron cuatro muestras (dos de Michoacán y dos de Morelos) con el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y se mandaron a secuenciar a la compañía de Macrogen Inc. en Korea del Sur, y las secuencias se compararon en la base de datos del banco de datos de secuencias genéticas (GenBank) de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

2.4.4 Colecta e identificación de arvenses

Los muestreos se hicieron en presencia y ausencia del cultivo. El muestreo fue dirigido en base a cuatro criterios: a) a arvenses previamente reportados como hospedantes de IYSV (Sampangi *et al.*, 2007; Weilner y Bedlan 2013; Schwartz *et al.*, 2014), b) plantas con síntomas putativos a virosis (mosaicos, clorosis, deformaciones foliares y manchas blancas), c) plantas cercanas a plantas de cebolla que presentaban síntomas de virus y asintomáticas, y d) las arvenses más abundantes en el momento del

muestreo. Las plantas fueron almacenadas en bolsas de plástico con papel periódico húmedo para ser transportadas al laboratorio y almacenadas a 4 °C para su respectivo procesamiento e identificación. La identificación de las arvenses se realizó con el apoyo de claves taxonómicas (Rzedowski *et al.*, 2001; Rzedowski *et al.*, 2005; Espinosa y Sarukhán, 1997; Vibrans y Tenorio, 2012) y la colaboración del M. C. Juan Carlos Delgado, especialista en malezas de Guanajuato.

2.4.5 Presencia de trips de las arvenses

Todas las arvenses colectadas se revisaron por el haz y envés de las hojas para verificar la presencia de trips y posteriormente colectarlos. Con un pincel de punta fina se pasaron de forma individual todos los trips adultos o ninfas (según fuera el caso) encontrados, a frascos de plástico con diferentes aberturas cubiertas con tela de organza para permitir la entrada de aire, y dentro de ellos se colocaron ejotes frescos (*Phaseolus vulgaris*) para su alimentación y formar colonias de trips (Figura 2). Todos los frascos fueron etiquetados con la clave del arvense donde se localizaron los trips. Los ejotes se sustituyeron por ejotes frescos dos veces por semana según se requiriera. Las colonias se mantuvieron en laboratorio con un fotoperiodo de 12 h, una temperatura promedio de 24 ± 1 °C y 42 % de humedad relativa. Las colonias se observaron cada tercer día hasta obtener un incremento de individuos para su identificación por PCR COI.



Figura 2. Esquematización de la colecta de trips de plantas arvenses y formación de colonias en frascos con ejotes.

2.4.6 Detección de IYSV en arvenses

Se utilizó el método serológico DAS-ELISA con anticuerpos específicos para el IYSV siguiendo las indicaciones del fabricante (Agdia®). Se analizaron por duplicado muestras compuestas de cada planta consistentes en hojas de la parte baja, media y alta; en el caso de plantas arvenses con presencia de sintomáticas se tomó parte sana y enferma. Se incluyó un control positivo y negativo (tejido de cebolla sana) (Agdia®). Las muestras se analizaron con un espectrofotómetro a una absorbancia de 405 nm (A_{405}). La reacción se consideró positiva si el valor de absorbancia fue tres veces mayor a la media del control negativo (Sutula *et al.*, 1986).

2.4.7 Identificación molecular de especies de trips

Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo con CTAB utilizando 15 adultos por cada colonia obtenida de la planta arvensa: se agregó 600 μ L del amortiguador CTAB (1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl, 10 % CTAB y agua destilada), 3 μ L de β -mercaptoetanol y 10 μ L de SDS a 20 % de concentración y se dejó a una temperatura de 60 °C por 45

min en el termoblock, durante ese tiempo se realizó la lisis de los insectos con ayuda de un pistilo. Posteriormente se dejó por 5 min a temperatura ambiente y se agregó 300 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por vortex y se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa (300 µL) y se adicionó 600 µL de alcohol isopropanol (2:1). Se dejó a -20 °C por 20 min y posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min a 4 °C. Se recuperó la pastilla eliminando el sobrenadante y se realizó el lavado con 1000 µL de alcohol a 70 % y se volvió a centrifugar a 12 000 rpm por 5 min. Se eliminó el alcohol y dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en agua destilada estéril (30 µL) y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

PCR de los trips

El ADN de los trips se cuantificó con un espectrofotómetro (NanoDrop®) para verificar su calidad y concentración. La PCR se realizó con iniciadores específicos que amplifican un fragmento de 710 pb del gen que codifica la proteína del citocromo oxidasa I (COI): LCO1490 (5'GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G3') y HCO2198 (5'TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA3') (Folmer *et al.*, 1994). La PCR se realizó en una reacción total de 25 µL: 1.25 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL de dNTP's (10 mM), 0.5 µL de cada iniciador (10 mM), 0.5 µL de Taq polimerasa, 2.5 µL buffer de PCR 10X, 4 µL de DNA (10-50 ng/µL) y agua. La PCR se realizó con las siguientes condiciones: 94 °C por 4 min para la desnaturalización inicial, seguidos por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos

amplificados se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa a 1 % que contenía bromuro de etidio por medio de un fotodocumentador.

2.4.8 Análisis de las secuencias de trips

Los productos de PCR se purificaron con Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y fueron enviados a la compañía de Macrogen Inc. en Korea del Sur donde se secuenciaron en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas LITE versión 2.1.1 y posteriormente se crearon secuencias consenso de cada muestra con el programa Vector NTI 8. Todas las secuencias obtenidas en este estudio se compararon en el banco de datos de secuencias genéticas (GenBank). Adicionalmente se tomaron secuencias de GenBank para realizar el análisis filogenético junto con las secuencias obtenidas, cinco secuencias de *T. palmi* (FM956392.1 AM932032.1, FM956397.1, AM931993.1 y AM932004.1) (Glover *et al.*, 2010) y cuatro de *T. tabaci* (KJ495744.1) (Li *et al.*, 2014), (KP871330.1, KP871492.1 y KP871492.1) (Iftikhar *et al.*, 2016). Las secuencias consenso se alinearon y se construyó un árbol filogenético, con base en UPGMA con MEGA 6.06 (Análisis Genético de Evolución Molecular) (Tamura *et al.*, 2013).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Detección de IYSV en cebolla

En las plantaciones jóvenes (antes de la formación de bulbo) no se detectó el virus, pero si en aquellas plantaciones donde el bulbo de la cebolla ya estaba desarrollada. Los síntomas observados variaron de manchas de forma alargada de color pajizo-cloróticas a manchas con presencia de una isla verde en el centro (Figura 3). Los síntomas de la isla verde en el centro de la lesión fueron vistos con frecuencia en el estado de Michoacán. Mediante la técnica de RT-PCR se confirmó la presencia en las diez parcelas de cebolla muestreadas para ambos estados, en los ciclos de otoño-invierno de 2014-2015 y 2015-2016, con una banda de 750 pb (Figura 4 y 5).



Figura 3. Síntomas de IYSV en plantas de cebolla: a) síntomas iniciales y avanzados de IYSV en forma alargada de color pajizo-cloróticas, localizados en el estado de Morelos y b) síntomas iniciales en forma alargada con presencia de una isla verde en el centro de la mancha y coalición de los síntomas, localizados en el estado de Michoacán.

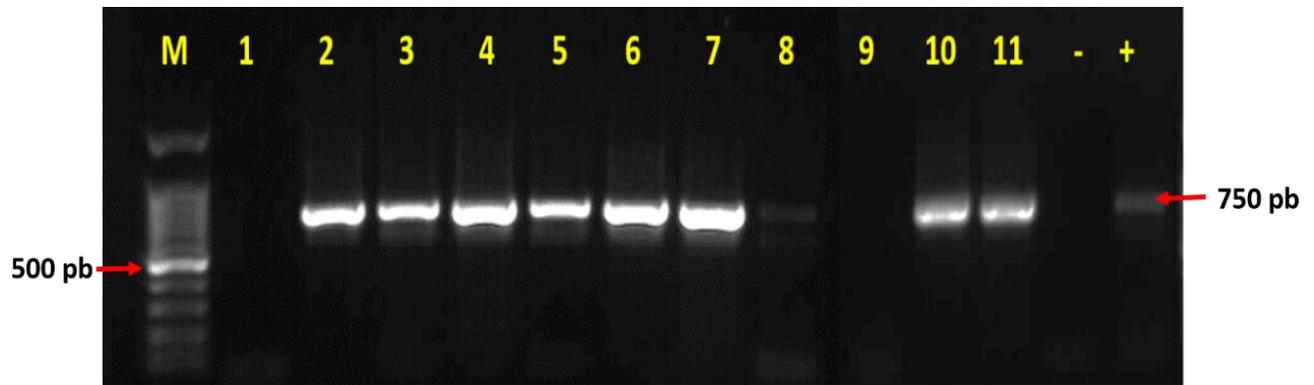


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa a 1 % de RT-PCR de IYSV en muestras de cebolla de Morelos y Michoacán. M: marcador molecular de 100 pb (Promega®); carril: 1 y 2: plantas de Vista Hermosa, Mich.; carril 3-6: plantas de Tanhuato, Mich.; carril 7 y 8: Xochitepec, Mor.; carril 9 y 10: Puente de Ixtla, Mor.; carril 11: Zacatepec, Mor.; carril (-): Testigo negativo (Agua); carril (+): Planta de cebolla positiva.

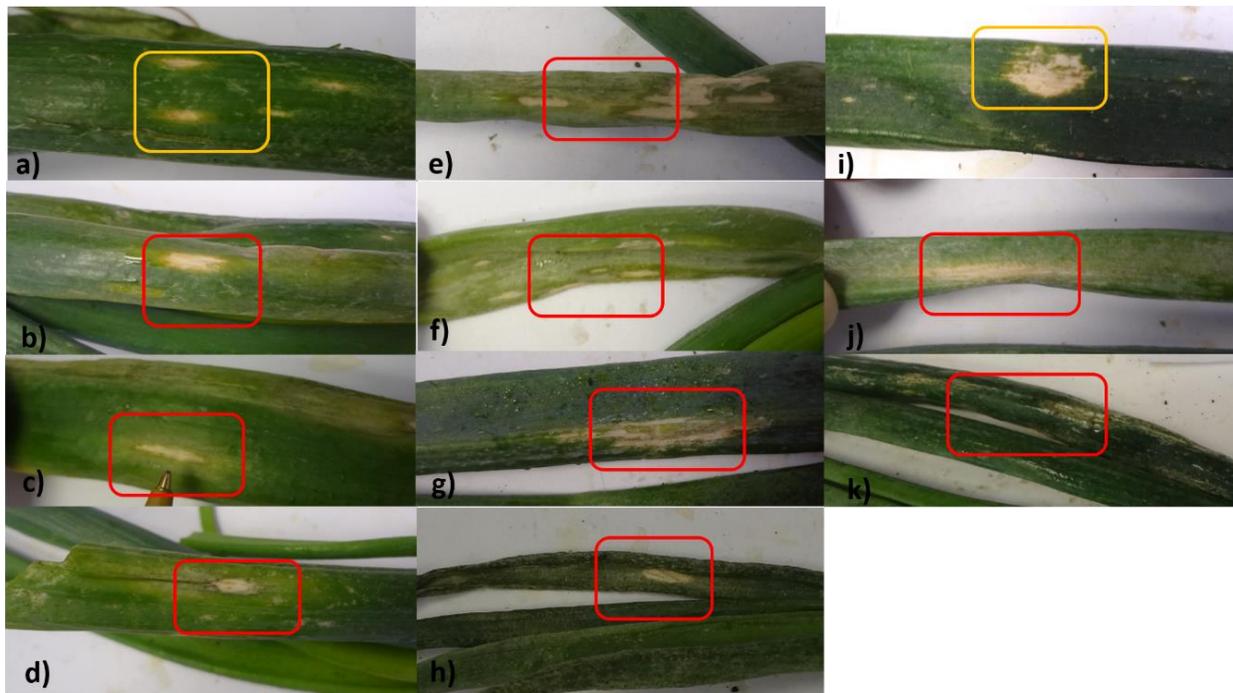


Figura 5. Muestras de cebolla con síntomas asociados a IYSV, las cuales se les realizó RT-PCR. **a y b)** Vista Hermosa, Mich. **c-f)** Tanhuato, Mich. **g-h)** Atlacholaya, Mor. **i-j)** Puente de Ixtla, Mor. **k)** Zacatepec, Mor. Muestras: **a, i)** plantas negativas para IYSV por RT-PCR.

2.5.2 Colecta e identificación de arvenses

Se analizaron 295 muestras en total, agrupadas en 56 especies pertenecientes a 23 familias (Cuadro 1). La mayor diversidad y presencia de especies se presentó en el estado de Morelos con 41 especies (18 familias) de 212 muestras de arvenses, mientras que en Michoacán solo se detectaron 26 especies (14 familias) de 83 muestras de arvenses colectadas. Las arvenses *Ricinus communis*, *Acalypha ostryifolia*, *Parthenium hysterophorus* y *Tithonia tubaeiformis* fueron de mayor abundancia en el estado de Morelos observándose en todos los muestreos. Mientras que *Amaranthus hybridus*, *Parthenium hysterophorus*, *Sonchus oleraceus* y *Chenopodium murale* lo fueron en Michoacán (Figura 6), a excepción de *P. hysterophorus* y *A. hybridus* que se presentaron en ambos estados con alta frecuencia.

Cuadro 1. Especies de arvenses trips, ubicación, época de colecta y análisis por DAS-ELISA para detectar la presencia de IYSV en los estados de Morelos y Michoacán.

Familia/especie	Plantas con trips/Plantas revisadas	Municipios de Morelos*Michoacán	Municipios donde se encontraron plantas con trips	Época de colecta de arvenses Morelos*Michoacán	Plantas analizadas ELISA/Plantas negativas para IYSV
Acanthaceae					
<i>Dicliptera peduncularis</i>	2 ^b /4 ^c	Ay/ Ez	Ay	IVO	4/4 (-)
Amaranthaceae					
<i>Amaranthus hybridus</i>	7/27	Ay/Ax/Ez *Vh/Ta	Ay *Vh	IVO *IO	27/27 (-)
<i>Amaranthus sp.</i>	0/2	Pi/Xo	Np	V	2/2 (-)
<i>Amaranthus spinosus</i>	0/4	Ax/Ay	Np	O	4/4 (-)
Apiaceae					
<i>Spananthe paniculata</i>	0/1	Ez	Np	O	1/1 (-)
Asteraceae					
<i>Parthenium hysterophorus</i>	6/34	Ay/Ax/Pi/Za/Ez/Xo * Vh/Ta	Ay/Ax/Ez*Vh /Ta	IVO*OI	34/34 (-)
<i>Bidens pilosa</i>	0/5	Ay/Za	Np	IVO	5/5 (-)
<i>Tithonia tubiformis</i>	4/17	Ax/Pi/Ay/Xo*Vh	Pi/Ez/Ax	IVO*O	17/17 (-)
<i>Tithonia diversifolia</i>	0/5	Vh	Np	OI	5/5 (-)
<i>Lactuca serriola</i>	1/1	Vh	Vh	I	1/1 (-)
<i>Verbesina crocata</i>	0/4	Ax/Pi/Ay	Np	IO	4/4 (-)
<i>Conyza spp.</i>	0/3	Ay * Ta	Np	I * I	3/3 (-)

Presencia de trips e identificación de IYSV en arvenses asociadas al cultivo de cebolla

<i>Taraxacum officinale</i>	0/1	Ay	Np	I	1/1 (-)
<i>Flaveria trinervia</i>	0/5	Xo/Ay * Vh	Np	IV * O	5/5 (-)
<i>Aldama dentata</i>	0/1	Pi	Np	V	1/1 (-)
<i>Melampodium sp.</i>	0/2	Ay	Np	VO	2/2 (-)
<i>Sanvitalia procumbens</i>	0/4	Ay/Pi/Xo	Np	IVO	4/4 (-)
<i>Sonchus oleraceus</i>	1/10	Ay * Vh/Tan	Vh	I * IO	10/10 (-)
<i>Galinsoga parviflora</i>	0/1	Vh	Np	O	1/1 (-)
Chenopodiaceae					
<i>Chenopodium murale</i>	0/6	Ta/Vh	Np	IO	6/6 (-)
<i>Chenopodium album</i>	0/1	Ta	Np	O	1/1 (-)
Commelinaceae					
<i>Tinantia erecta</i>	0/1	Ez	Np	O	1/1 (-)
Convolvulaceae					
<i>Ipomoea purpurea</i>	2/7	Ay/Ez/Xo/Pi * Ta	Ez/Ay	IVO * I	7/7 (-)
<i>Ipomoea batatas</i>	0/1	Ez	Np	V	1/1 (-)
Cruciferae					
<i>Lepidium virginicum</i>	1/5	Ay/Ax*Vh/Ta	Ta	I * I	5/5 (-)
<i>Raphanus sativus</i>	0/1	Ay	Np	I	1/1 (-)
Cyperaceae					
<i>Cyperus spp.</i>	0/1	Ax	Np	I	1/1 (-)
Euphorbiaceae					
<i>Acalypha ostryifolia</i>	10/27	Ay/Xo/Jo/Pi/Ez/Ax *Ta	Jo/EZ/Ay/Ax	IVO*O	27/27 (-)
<i>Ricinus comunis</i>	30/31	Ax/Pi/Ez/Ay*Vh	Ax/Pi/Ez/Ay* Vh	IVO*OI	31/31 (-)
<i>Acalypha arvensis</i>	1/11	Xo/Pi/Ez/Xo	Pi	IVO	11/11 (-)
<i>Euphorbia heterophylla</i>	0/3	Ay/Ax	Np	IO	3/3 (-)
<i>Euphorbia indivisa</i>	0/1	Ay	Np	I	1/1 (-)
<i>Euphorbia berteroana</i>	0/2	Ay/Ez	Np	V	2/2 (-)
<i>Euphorbia sp.</i>	0/3	Ax/Pi	Np	I	3/3 (-)
Fabaceae					
<i>Crotolaria pumila</i>	0/1	Ax	Np	I	1/1 (-)
<i>Melilotus indica</i>	0/1	Vh	Np	I	1/1 (-)
Lamiaceae					
<i>Salvia tiliifolia</i>	0/2	Vh/Ta	Np	O	2/2 (-)
Malvaceae					
<i>Malva parviflora</i>	2/6	Ta/Vh	Ta/Vh	IO	6/6 (-)
<i>Anoda cristata</i>	3/5	Pi/Ay/Ax	Pi/Ax	IVO	5/5 (-)
<i>Malvastrum coromandelianum</i>	2/9	Za/Pi/Ay/Ax	Ay/Ax	OVI	9/9 (-)
<i>Malvastrum bicuspidatum</i>	0/1	Ax	Ax	O	1/1 (-)
Mimosaceae					
<i>Acacia farnesiana</i>	0/1	Ax	Np	I	1/1 (-)
Onagraceae					
<i>Oenothera rosea</i>	0/1	Ay	Np	I	1/1 (-)
Oxalidaceae					

Presencia de trips e identificación de IYSV en arvenses asociadas al cultivo de cebolla

<i>Oxalis corniculata</i>	0/1	Vh	Np	I	1/1 (-)
Poaceae					
<i>Setaria grisebachii</i>	0/1	Ay	Np	I	1/1 (-)
Polygonaceae					
<i>Rumex crispus</i>	0/1	Ta	Np	I	1/1 (-)
Portulacaceae					
<i>Portulaca oleracea</i>	0/12	Ay/Ax/Pi/Ez*Vh/T a	Np	IVO*O	12/12 (-)
Rubiaceae					
<i>Spermacoce confusa</i>	0/1	Ay	Np	I	1/1 (-)
Solanaceae					
<i>Solanum rostratum</i>	0/3	Ay/Ax/Pi	Np	IV	3/3 (-)
<i>Solanum nigrum</i>	0/2	Vh	Np	O	2/2 (-)
<i>Capsicum annuum</i>	0/1	Vh	Np	V	1/1 (-)
<i>Capsicum sp.</i>	0/2	Pi	Np	V	2/2 (-)
<i>Physalis ixocarpa</i>	0/2	Vh	Np	O	2/2 (-)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	0/1	Ta	Np	O	1/1 (-)
Vitaceae					
<i>Vitis vinifera</i>	0/1	Ta	Np	O	1/1 (-)
Zygophyllaceae					
<i>Kallstroemia rosei</i>	0/7	Ay/Xo/Pi/Ax	Np	IVO	7/7 (-)

Ay: Ayala, Mor.; **Xo:** Xochitepec, Mor.; **Jo:** Jojutla, Mor.; **Pi:** Puente de Ixtla, Mor.; **Ez:** Emiliano Zapata, Mor. **Ax:** Axochiapan, Mor.; **Za:** Zacatepec, Mor.; **Vh:** Vista Hermosa, Mich.; **Ta:** Tanhuato, Mich.; **I:** invierno (diciembre, enero); **V:** verano (julio); **O:** Otoño (octubre); **Np:** No presente en muestreo.

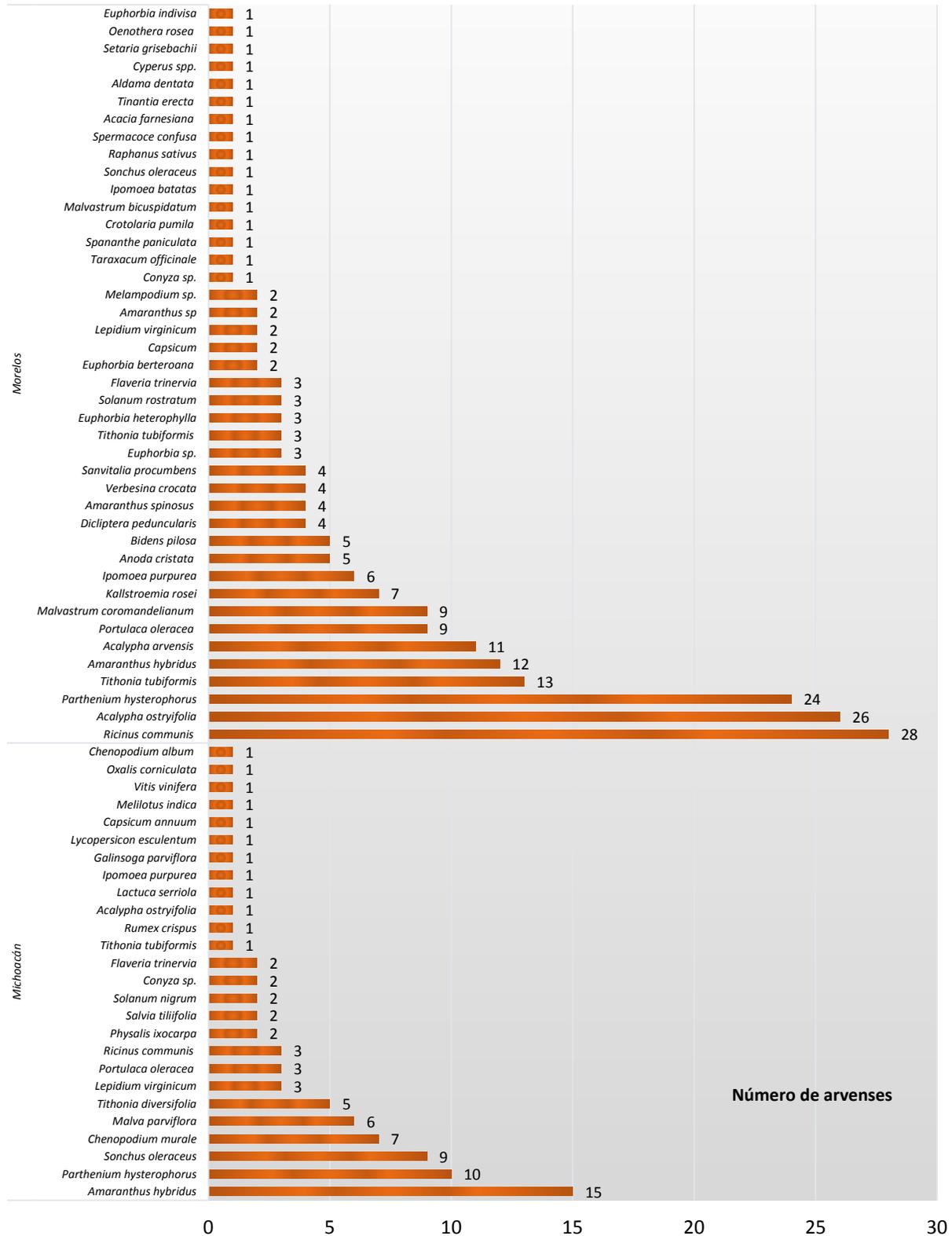


Figura 6. Distribución de frecuencias del total de especies de arvenses analizadas para IYSV por DAS-ELISA en el estado de Morelos y Michoacán.

2.5.3 Presencia de trips

En 75 de 295 plantas (25 %) se encontraron trips, 14 plantas (agrupadas en siete especies de arvenses) fueron colectadas en el estado de Michoacán y 61 plantas (que incluyen 13 especies de arvenses) en Morelos. Las arvenses se concentraron en las familias *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Amaranthaceae*, *Cruciferae*, *Convolvulaceae*, *Malvaceae* y *Acanthaceae*. Del total de arvenses con presencia de trips solo 6 % se colectaron dentro de las parcelas de cebolla en el estado de Morelos, en *R. communis* (cuatro plantas) y *T. tubiformis* (una planta). El resto de las arvenses con presencia de trips fueron colectadas en las orillas de las parcelas. Por otro lado, de estas 75 arvenses, en el estado de Morelos se colectaron 42 arvenses en ausencia del cultivo y 19 arvenses en presencia del cultivo de cebolla; y en Michoacán, 11 arvenses con trips en ausencia del cultivo y solo tres en presencia del cultivo (Figura 7).

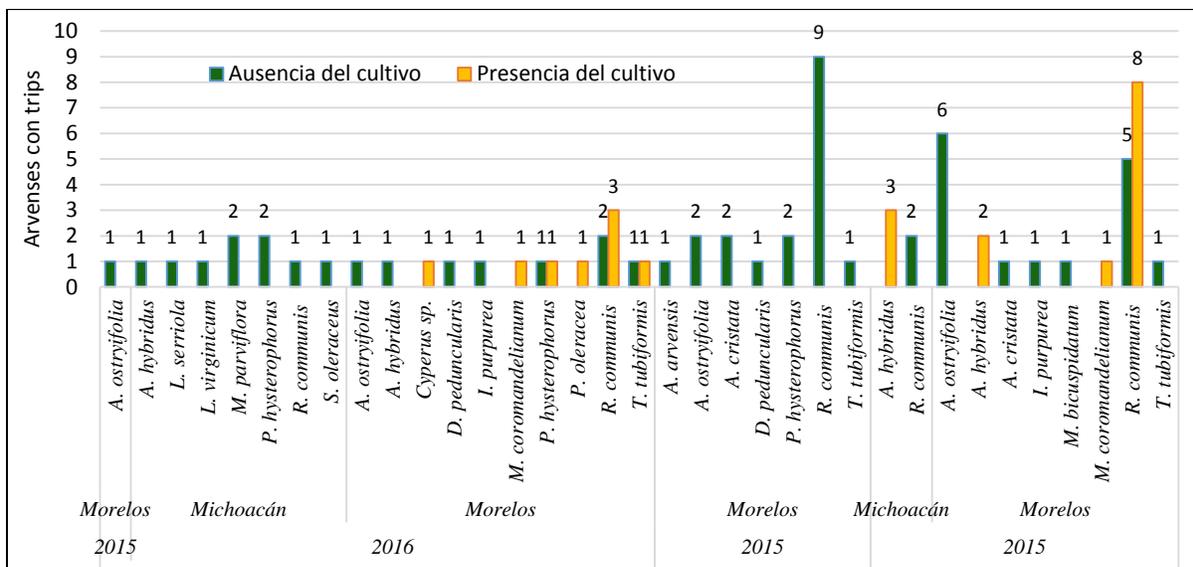


Figura 7. Frecuencia de trips inmaduros y/o adultos en arvenses, en presencia y ausencia del cultivo de la cebolla en Morelos y Michoacán.

Los trips se encontraron en su mayoría en *Ricinus communis* (30 de 31 plantas observadas) seguido por *Acalypha ostryifolia*, *Amaranthus hybridus* y *Parthenium hysterophorus* en menor frecuencia, así como el resto de las arvenses (Figura 8). Dichas arvenses fueron abundantes en todas las parcelas muestreadas en el estado de Morelos. La mayor parte de las poblaciones de trips se observaron en ausencia del cultivo de la cebolla (Figura 7). Así mismo, se observó aumento de las poblaciones de trips en las plantaciones de cebolla con etapas fenológicas avanzadas.



Figura 8. Principales arvenses hospederas de *T. tabaci* en los estados de Morelos y Michoacán: a) *P. oleracea*, b) *A. ostryifolia*, c) *A. cristata*, d) *T. tubiformis*, e) *M. parviflora*, f) *I. purpurea*, g) *L. virginicum*, h) *A. hybridus*, i) *R. comunis*, j) *S. oleraceus* y k) *P. hysterophorus*.

2.5.4 Detección de IYSV en arvenses

De las 295 muestras de arvenses colectadas y analizadas se llegaron a observar presencia de síntomas relacionados a virosis, pero ninguna de las muestras fue positiva para *Iris yellow spot virus* (Cuadro 1). Conviene mencionar que solo 102 arvenses (34 %) mostraron síntomas putativos de virosis como mosaicos, amarillamiento, deformación foliar y manchas cloróticas. El resto de las plantas no presentaron evidencias de síntomas causados por virosis (Figura 9).

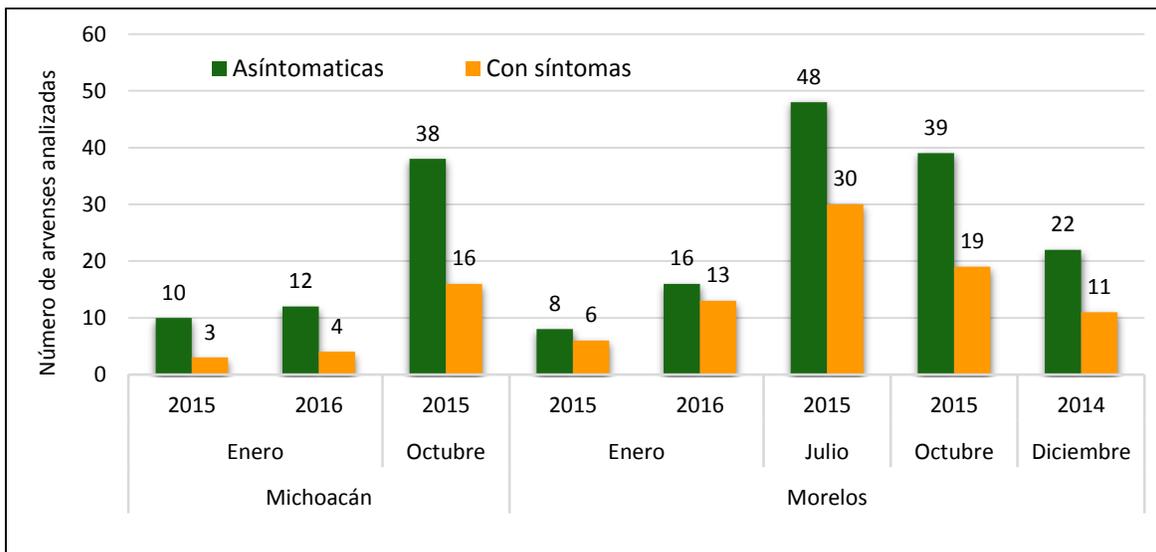


Figura 9. Arvenses colectadas con síntomas sospechosos de virosis y plantas asintomáticas para el análisis de *Iris yellow spot virus* por DAS-ELISA, en los estados de Michoacán y Morelos, México.

2.5.5 Identificación molecular de especies de trips

PCR de los trips

De las 75 colonias de trips establecidas procedentes de las arvenses, solo se lograron incrementar 33 poblaciones. Todas las muestras presentaron un amplicón de

710 pb (Figura 10), 25 correspondieron a poblaciones de Morelos agrupados en 12 especies de arvenses y ocho a Michoacán (siete especies de arvenses).

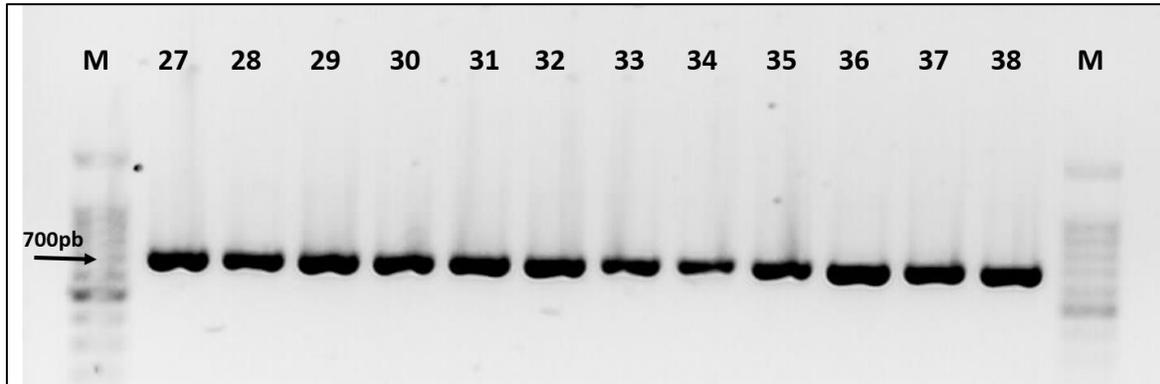


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa a 1 % de PCR de muestras de trips obtenidas de arvenses. M: marcador molecular de 100 pb (Promega®); 27-38: DNA de trips obtenidas de diversas especies de arvenses de Morelos y Michoacán.

2.5.6 Análisis de las secuencias de trips

Se secuenciaron 33 amplicones, obteniendo una identidad de 97 a 100 % para *Thrips tabaci* (Cuadro 2). El análisis filogenético de las secuencias incluyendo secuencias de trips obtenidas de plantas de cebolla y del Genbank se agruparon en un solo grupo que correspondió a *T. tabaci*; sin embargo, dentro de este grupo se observó los dos grupos separados, las secuencias del Genbank y las de la investigación, mismas que se diferenciaron de *T. palmi*. (Figura 11).

Cuadro 2. Colonias de trips colectadas en diferentes especies de arvenses e identificadas por PCR COI, en las regiones productoras de cebolla de los estados de Morelos y Michoacán.

Arvense colectada con presencia de trips	Municipios de Morelos*Michoacán	Época de colecta de trips	No. secuencias con identidad a <i>T. tabaci</i>	Porcentaje de identidad en GenBank
<i>Ricinus communis</i>	Pi/Ax/Ay/Ez*Vh	VOI*I	10	97-100 %
<i>Amaranthus hybridus</i>	Ay*Vh	OI*I	4	99-100 %
<i>Tithonia tubiformis</i>	Ax/Ez/Pi	OI	3	99-100 %
<i>Parthenium hysterophorus</i>	Ez*Ta/Vh	I	3	97-100 %
<i>Acalypha ostryifolia</i>	Ax/Ez	OI	2	99-100 %
<i>Acalypha arvensis</i>	Pi	V	1	99 %
<i>Anoda cristata</i>	Ax	O	1	100 %
<i>Ipomoea purpurea</i>	Ay	I	1	99 %
<i>Dicliptera peduncularis</i>	Ay	I	1	100 %
<i>Portulaca oleracea</i>	Ax	I	1	100 %
<i>Malvastrum coromandelianum</i>	Ax	I	1	99 %
<i>Cyperus</i> sp.	Ax	I	1	100 %
<i>Lepidium virginicum</i>	Ta	I	1	99 %
<i>Malva parviflora</i>	Vh	I	1	97 %
<i>Sonchus oleraceus</i>	Vh	I	1	99 %
<i>Lactuca serriola</i>	Vh	I	1	99 %

Ay: Ayala, Mor.; **Pi:** Puente de Ixtla, Mor.; **Ez:** Emiliano Zapata, Mor. **Ax:** Axochiapan, Mor.; **Vh:** Vista Hermosa, Mich.; **Ta:** Tanhuato, Mich; **I:** invierno (enero 2016); **V:** verano (julio 2015); **O:** Otoño (octubre 2015).

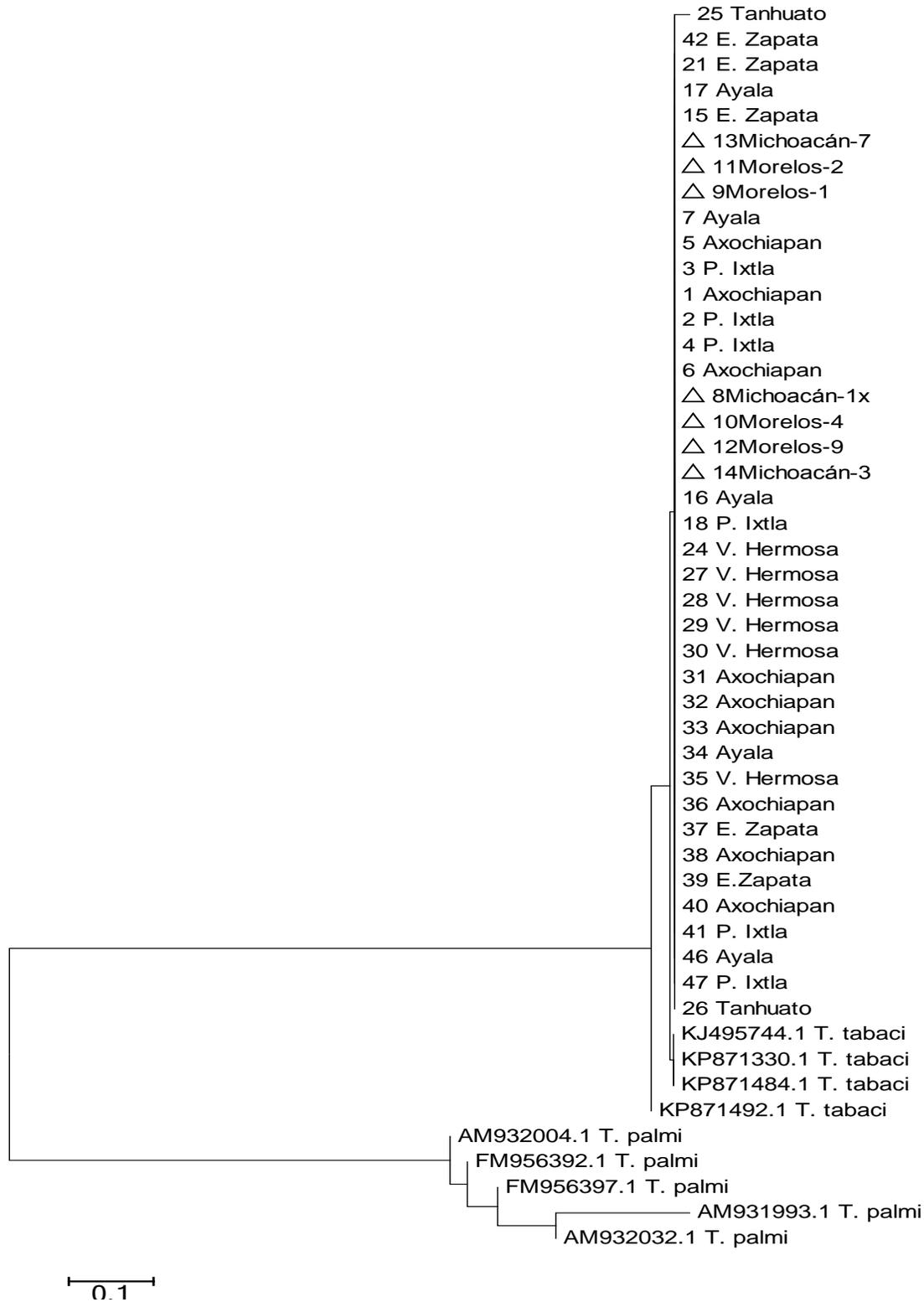


Figura 11. Árbol filogenético de secuencias de nucleótidos de *T. tabaci* y secuencias obtenidas de GenBank cuyos números de accesiones se especifica por UPGMA.

2.6 DISCUSIÓN

Los síntomas encontrados en las parcelas muestreadas causadas por el virus IYSV fueron como los reportadas por otros autores (Gent *et al.*, 2006; Ramírez-Rojas *et al.*, 2016), donde los síntomas varía de lesiones alargada cloróticas o necróticas o bien blancas-pajizo en la parte baja o media de las hojas. En el estado de Morelos, los síntomas más evidentes observados fueron lesiones alargadas de color pajizo-cloróticas. Conforme avanzó la enfermedad se observó el colapso de los síntomas y la muerte parcial o total de la hoja de cebolla. Estos resultados coinciden con Ramírez-Rojas *et al.* (2016), que reportan la presencia del IYSV en Morelos. Por otro lado, las islas verdes en las lesiones se detectaron con mayor frecuencia en el estado de Michoacán. Hasta el momento no se tiene registro del virus en este estado.

Las variaciones mencionadas en síntomas también coincide con lo reportado por Bag *et al.* (2015) que describen los síntomas, resaltando que el virus produce variaciones en plantas de cebolla, haciendo énfasis como característica las islas verdes en el centro de las lesiones como medida de diagnóstico. La variación de síntomas observados en este estudio pudo verse influenciado por varios factores, como el manejo del cultivo, condiciones climáticas, capacidad del vector en transmitir el virus, la variabilidad del virus y vector, así como las variedades que se utilizan. Esta información se puede reforzar con lo sugerido por Bag *et al.* (2012), quienes mencionan que la expresión de la diversidad de síntomas de IYSV puede ser atribuido a varios factores como condiciones climáticas, edad del cultivo, cultivares, tiempo de infección entre otros.

En los últimos años, no solo se han hecho reportes de infecciones de IYSV en el género *Allium*, también en una gama de hospedantes diferentes al género con presencia de este virus en forma natural (Schwartz *et al.*, 2014; Hsu *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012; Weilner y Bedlan, 2013; Szostek y Schwartz, 2015; Karavina y Gubba, 2017), de las cuales algunas fueron encontradas en algunas parcelas muestreadas en este estudio. Entre las arvenses que han sido reportadas como hospedantes de IYSV, se encontraron a *S. oleraceus*, *S. nigrum*, *C. album*, *L. serriola* y *P. oleracea* en el estado de Michoacán; así como a *R. communis* y *P. oleracea* en el estado de Morelos, mismas que han sido reportadas como hospedantes naturales de IYSV en otros países por DAS-ELISA (Schwartz *et al.*, 2014; Karavina y Gubba, 2017). La mayor diversidad y frecuencia de arvenses se observó en Morelos comparado con el estado de Michoacán. Esto puede estar asociado al manejo que se le da a las parcelas en este estado, como el acolchado, rotación de cultivos y control de las arvenses consistiendo en deshierbes y aplicación de herbicidas, disminuyendo su abundancia de arvenses en las parcelas.

Pese a la información que se tiene internacionalmente de los hospedantes alternos con presencia del virus en otros países, en México se tiene poca información al respecto. Hasta el momento solo se tiene reportado la presencia de IYSV por DAS-ELISA en *Amaranthus* spp., *Bidens odorata*, *Brassica campestris*, *Chenopodium* spp., *Eruca sativa*, *Malva parviflora*, *Medicago sativa*, *Sisimbrio* spp. y *S. oleraceus* en las zonas productoras de cebolla de Zacatecas; no obstante, los autores no profundizan del número de plantas evaluadas y número de muestras positivas para el virus (Velásquez-Valle *et al.*, 2013). En el caso del estado de Morelos Ramírez-Rojas *et al.* (2016) reportaron una

incidencia total y una severidad superior al 90 % del virus en todas las zonas productoras de cebolla, pero no evaluaron la presencia del virus en arvenses. Pese que en nuestros estudios también se analizaron las arvenses, ninguna de las arvenses analizadas resultó positiva al IYSV; sin embargo, no se descarta la posibilidad de ser reservorios naturales del virus, ya que el virus no es sistémico, es decir, es un virus localizado por lo que su detección pueden verse influenciada aun cuando se utilizan pruebas sensibles como DAS-ELISA o RT-PCR (Gent *et al.*, 2006). Esto se ha demostrado en el caso de la cebolla, donde la distribución heterogénea del virus puede dar falsos negativos tendiendo a subestimar su incidencia (Hsu *et al.*, 2010). Así mismo, Ochoa *et al.* (1996) señalan que el tener muestras negativas en arvenses no involucra que no sea reservorio del virus. Es posible también que durante las fechas de colecta de las arvenses no se haya tenido la carga viral detectable por DAS-ELISA debido a que se desconoce el tiempo de inoculación por los trips. Por ello, es importante hacer un mayor estudio en estas arvenses para aseverar su ausencia del virus y no ser un problema en un futuro como hospederas alternas ante la falta del hospedante principal.

Con lo que compete a los trips, solo *T. tabaci* tiene alta eficiencia de transmisión del IYSV, siendo el principal vector (Gent *et al.*, 2004; Diaz-Montano *et al.*, 2011). En México se tiene la presencia en las plantaciones de cebolla (Velásquez-Valle *et al.*, 2013) y solo García-Rodríguez *et al.* (2014) hicieron estudios de la presencia del virus confirmando el IYSV en poblaciones de *T. tabaci* localizados en el cultivo de ajo. En nuestro estudio solo se evaluó la presencia de trips en arvenses, encontrando la mayor presencia en ausencia del cultivo y en las orillas de las parcelas en ambos estados,

observándose principalmente estados inmaduros en las partes vegetativas de las plantas. Esto sugiere que estas plantas pueden ser fundamentales para la epidemiología del virus al servir como reservorio del insecto ante la ausencia del cultivo de cebolla. Este resultado coincide con lo reportado por Szostek y Schwartz (2015) quienes reportaron en ausencia del cultivo, la presencia del vector así como del virus en diferentes arvenses. Las arvenses que se colectaron en las orillas de las parcelas, juegan un papel importante al encontrarse poblaciones de trips. Estos resultados son respaldados por Milne y Walter, (1998) quienes hacen mención que ante la ausencia del cultivo, los trips migran a plantas cercanas al cultivo y se reproducen en ellas, ya sea en las partes vegetativas o inflorescencias. Pese que en su mayoría los trips se encontraron en las partes vegetativas, también se observaron adultos en las inflorescencias de algunas arvenses. Los adultos fueron observados principalmente a los pocos días de haberse cosechado la cebolla, y estos se localizaron principalmente en las inflorescencias.

Algunas arvenses no se han reportado como hospedantes del virus pero sí de su vector. Por ello es importante conocer las arvenses hospedantes del vector y su abundancia como parte de un estudio epidemiológico con la finalidad de optimizar el manejo de la enfermedad (Smith *et al.*, 2011).

R. communis (30 plantas) y *A. ostryifolia* (nueve plantas) fueron las arvenses más frecuentadas por los trips, observándose estados inmaduro y adulto principalmente en el estado de Morelos. En el caso de *R. communis*, Schwartz *et al.* (2014) encontraron a esta especie como hospedante de IYSV, pero no del insecto. Nuestros resultados muestran una gran abundancia de esta especie en Morelos que además de hospedar al

insecto es hospedera del virus, lo que sugiere la probabilidad del papel que juega en la alta incidencia del virus en este estado de Morelos comparado con el estado de Michoacán.

Por otra parte, *T. tabaci* no solo es transmisor de IYSV, sino de otros virus como *Tomato varamin virus* (ToVV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) y *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Ghotbi *et al.*, 2005) que afectan a cultivos de gran importancia en la región. En todas las muestras analizadas se encontró a *T. tabaci* como única especie en las áreas muestreadas por medio de PCR COI, con una identidad superior a 97%. Pese a la ausencia del virus en las arvenses en este estudio, el confirmar la presencia del vector y su reproducción en las arvenses, ofrece importante información pues pone de manifiesto el riesgo de ser reservorios del putativo vector y posiblemente portadoras del virus que sin duda puede afectar las siguientes plantaciones de cebolla. En ambos estados se tuvo presencia de trips en las plantaciones y su población fue aumentando conforme avanzaba la fenología de la planta.

Aún no se ha demostrado la trasmisión transovárica de IYSV en trips por lo que los individuos de cada generación deben adquirir al virus para poder transmitirlo (Weilner y Bedlan, 2013). Por otro lado, se sabe que muchos de estos vectores pueden reproducirse exitosamente en diversas especies no cultivadas y permanecer en las partes vegetativas y de manera preferente en las inflorescencias cuya presencia depende de la época del año (Milne y Walter, 1998). Estos datos indican que los trips pueden permanecer indefinidamente en determinada zona aún durante la ausencia del cultivo de cebolla. El

adecuado control de las arvenses antes del aumento de las poblaciones de trips, podría reducir la migración de vectores (Chatzivassiliou *et al.*, 2007) o su movimiento a plantas voluntarias de cebolla (Ghotbi *et al.*, 2005) que pueden servir de reservorio del virus fuera del ciclo del cultivo aumentando la emergencia de infecciones tempranas en el siguiente ciclo (Hsu *et al.*, 2011).

Pese a la ausencia de IYSV en las arvenses analizadas, pero sí del trips en *R. communis*, *A. ostryifolia*, *P. hysterophorus* y *A. hybridus*, presentes en todas las localidades muestreadas de ambos estados, aumenta la probabilidad de ser hospederas del virus. Estos *Tospovirus* tienen la capacidad de utilizar al vector para infectar nuevos hospedantes, los cuales pueden aumentar su adaptabilidad al portar el virus, influyendo en su incidencia y distribución bajo condiciones ambientales diferentes y nuevos hospedantes (Jones, 2005).

La abundancia de arvenses con presencia de trips en el estado de Morelos comparado con el estado de Michoacán, puede ser una explicación importante de la problemática que se tiene de esta enfermedad en esta entidad, al servir las arvenses como hospederos del putativo vector con posible potencial de ser transmisores del virus. La práctica de eliminación de las arvenses que realizan en el estado de Michoacán, puede ser el factor importante por el cual se tiene inclusive bajas poblaciones de trips en las plantas de cebolla, inclusive el bajo registro de arvenses con poblaciones de trips en Michoacán a pesar de la diversidad de especies de arvenses presentes en esta entidad, comparado con el estado de Morelos.

Nuestros estudios sugieren la importancia de las arvenses como hospederos de *T. tabaci* en ausencia del cultivo, principalmente las que se encuentran en las orillas de las parcelas y la posibilidad de ser hospederos de IYSV en un futuro. Por ello, el tener un mayor conocimiento de dichas interacciones ayudaría a obtener mejores estrategias de manejo del cultivo. Así mismo, confinar los estudios solo a especies de arvenses donde se reproduce el insecto para detectar el IYSV puede darnos datos concisos para entender la epidemiología del virus en este cultivo.

2.7 CONCLUSIONES

- Se detectaron altas poblaciones de trips en *Ricinus communis*, seguidos por *Acalypha ostryifolia*, *Amaranthus hybridus* y *Parthenium hysterophorus*, en estado inmaduro y adulto. Se identificó a *Thrips tabaci* como única especie.
- Se encontró a *Ricinus communis* con alto potencial de hospedar a *T. tabaci* y con probabilidad de ser hospedero de IYSV.
- Ninguna especie de arvense fue positiva para IYSV por DAS-ELISA, pero juegan un papel importante en la intensidad de la enfermedad al ser reservorios del putativo vector.
- Se detectó la presencia de *Iris yellow spot virus* por RT-PCR en las diez parcelas muestreadas de ambos estados de Morelos y Michoacán.

2.8 LITERATURA CITADA

- Atakan E., and S. Uygur. 2005. Winter and spring abundance of *Frankliniella* spp. and *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) on weed host plants in Turkey. *Journal of Applied Entomology*. 129:17-26.
- Bag S., K. L. Druffel, T. Salewsky, and H. R. Pappu. 2009. Nucleotide sequence and genome organization of the medium RNA of *Iris yellow spot virus* from the United States. *Archives of Virology*. 154 (4): 715-718.
- Bag S., H. F. Schwartz, C. S. Cramer, M. J. Havey and H. R. Pappu. 2015. *Iris yellow spot virus* (*Tospovirus*: Bunyaviridae): from obscurity to research priority. *Molecular Plant Pathology*. 224-237.
- Bag, S., H. F. Schwartz, and H. R. Pappu. 2012. 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.
- Brewster J. L. 2008. Onion and other vegetable allium. 2nd edition. CAB International. Pág. 204.
- Chatzivassiliou, E. K., D. Peters and N. I Katis. 2007. The role of weeds in the spread of *Tomato spotted wilt virus* by *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in tobacco crops. *Journal Phytopathology*. 155:699-705.

- Diaz-Montano J., Fuchs M., Nault B. A., Fail J. and Shelton A. M. 2011. Onion Thrips (Thysanoptera: Thripidae): A global pest of increasing concern in onion. *Journal of Economic Entomology*. 104 (1): 1-13.
- Du Toi L. J., J. T. Burger, A. McLeod, M. Engelbrecht and A. Viljoen. 2007. Iris yellow spot virus in onion seed crops in South Africa. *Plant Disease*. 91(9):1203.
- Espinosa F., J. y J. Sarukhán, 1997. *Manual de Malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones*. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica, México, D. F.
- Folmer O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5): 294-299.
- García-Rodríguez O.G., Pérez-Moreno L., Navarro-León M. J., Salas-Araiza M. D., Martínez-Jaime O. A., León-Galván M. F. y Núñez-Palenius H. G. 2014. Virus Fitopatógenos en insectos asociados al ajo. *Revista Chapingo serie Horticultura* 20(2): 147-156.
- Gent D. H., H. F. Schwartz 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(5): 446-452.

- Gent D. H., L. J. du Toit, S. F. Fichtner, S. K. Mohan, H. R. Pappu and H. F. Schwartz. 2006. *Iris yellow spot virus*: An emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Disease*. 90 (12): 1468-1480.
- German, T. L., D. E. Ullman and J. W. Moyer. 1992. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. *Annual review of Phytopathology*. 30: 315-348.
- Ghotbi T., N. Shahraeen and S. Winter. 2005. Occurrence of Tospoviruses in ornamental and weed species in Markazi and Tehran provinces in Iran. *Plant Disease*. 89: 425-429.
- Glover R. H., D. W. Collins, K. Walsh and N. Boonham. 2010. Assessment of loci for DNA barcoding in the genus *Thrips* (Thysanoptera: Thripidae). *Molecular Ecology Resources*. 10:51-59.
- Hsu C. L., C. A. Hoepting, M. Fuchs, A. M. Shelton and B. A. Nault. 2010. Temporal dynamics of *Iris yellow spot virus* and its vector, *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae), in seeded and transplanted onion fields. *Environmental entomology*. 39(2): 266-277.
- Hsu C. L., C. A. Hoepting, M. Fuchs, E. A. Smith and B. A. Nault. 2011. Sources of *Iris yellow spot virus* in New York. *Plant Disease*. 95:735-743.

- Iftikhar R., M. Ashfaq, A. Rasool and P. D. Hebert. 2016. DNA barcode analysis of thrips (Thysanoptera) diversity in Pakistan reveals cryptic species complexes. PLoS ONE. 11(1): 1-21.
- Jones D. R. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. European Journal of Plant Pathology. 113: 119-157.
- Karavina C. and Gubba A. 2017. *Amaranthus* sp. and *Eleusine indica* are natural host of *Iris yellow spot virus* in Zimbabwe. Plant Disease. 262 p.
- Krauthausen H. J., M. E. Leeinhos, J. Müller, P. C. Radtke and J. A. Jehle. 2012. Identification and incidence of Iris yellow spot virus in *Allium* field crops in Southwest Germany. European Journal of plant Pathology. 134: 345-356.
- Li X., J. Fail, P. Wang, J. Feng and A. M. Shelton. 2014. Performance of arrhenotokous and thelyotokous *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) on onion and cabbage and its implications on evolution and pest management. Journal of Economic Entomology. 107(4): 1526-1534.
- Milne M. and G. H. Walter. 1998. Host species and plant part specificity of the polyphagous onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae), in an Australian cotton-growing area. Australian Journal of Entomology. 37: 115-119.
- Ochoa M.D.L., Zavaleta-Mejía E., Johansen N.R.M., Herrera G.A. and Cardenas-Soriano E. 1996. Tosspoviruses, weeds and thrips associated with chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Polaris). International journal of Pest Management. 42(3):157-159.

- Pérez-Moreno L, Navarro-León MJ, Ramírez-Malagón R y Mendoza-Celedón B. 2010. Impacto e Identificación de Virus Fitopatógenos Sobre Rendimiento y Calidad del Ajo (*Allium sativum* L), en el Estado de Guanajuato, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 28(2):97-110.
- Ramírez-Rojas S., K. Ornelas-Ocampo, F. de J. Osuna-Canizalez, J. C. Bartolo-Reyes y V. Varela-Loza. 2016. Detección de *Iris yellow spot virus* en cebolla cultivada en Tepalcingo, Morelos, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 34 (3): 308-315.
- Rodriguez S. P., G. Lindsey and P. M. B. Fernandes. 2007. Biotechnological approaches to the control of plant viruses. In Thangadurai D, Tang W. and Song SQ. Plant stress and biotechnology. 1st edition. Oxford book company. Jaipur, India. pp. 126-138.
- Rzedowski, G. C. de, y J. Rzedowski. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Rzedowski G. C. de y J. Rzedowski. 2005. Manual de malezas de la región de Salvatierra, Guanajuato. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo complementario XX. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz. 315 p.
- Sampangi R. K. and S. K. Mohan. 2007. Identification of new alternative weed hosts for *Iris yellow spot virus* in the Pacific Northwest. Plant Diseases. 91(12):1683.
- Schoonhoven L. M., J. J. A. van Loon, M. Dicke. 2005. Insect-Plant biology. Second edition. Oxford University, New York. Pp- 1-24.

- Schwartz H. F., D. H. Gent, S. M. Fichtner, K. Otto, C. O. Boateng, S. Szostek, W. S. Cranshaw and L. A. Mahaffey. 2014. *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) and *Iris yellow spot virus* associated with onion transplants, onion volunteers, and weeds in Colorado. *Southwestern Entomologist*. 39(4): 691-704.
- Smith E. A., A. DiTommaso, M. Fuchs, A. M. Shelton and B. A. Nault. 2011. Weed hosts for onion thrips (Thysanoptera: Thripidae) and their potential role in the epidemiology of *Iris yellow spot virus* in an onion ecosystem. *Environmental Entomology*. 40(2): 194-203.
- Smith E. A., A. DiTommaso, M. Fuchs, A. M. Shelton and B. A. Nault. 2012. Abundance of weed hosts as potential sources of onion and potato viruses in western New York. *Crop Protection*. 37: 91-96.
- Srinivasan R., S. Sundaraj, H. R. Pappu, S. Diffie, D. G. Riley and R. D. Gitaitis. 2012. Transmission of *Iris yellow spot virus* by *Frankliniella fusca* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology*. 105 (1): 40-47.
- Sutula C. L., J. M. Gillett, S. M. Morrissey and D. C. Ramsdell. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease*. 70 (8): 722-726
- Syller J. 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular plant pathology*. 13(2): 204-216.

- Szostek A.S. and H. F. Schwartz. 2015. Overwintering sites of *Iris yellow spot virus* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in Colorado. *Southwestern Entomologist*. 40(2): 273–290.
- Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725-2729.
- Tanveer A., A. Khalid, H. H. Ali, G. Mahajan and B. S. Chauhan. 2015. Interference and management of *parthenium*: The world's most important invasive weed. *Crop Protection*. 68: 49:59.
- Ullman E. D., R. Meideros, R. L. Campbell, E. A. Whitfield, L. J. Sherwood and L. T. German. 2002. Thrips as vectors of Tospoviruses. *In: Plumb T. R. 2002 Advances in Botanical research, incorporating Advances in Plant pathology*. Vol. 36. Elsevier Science. Pp. 113-140
- Velásquez-Valle y Reveles-Hernández, 2011. Detección del *Iris yellow spot virus* en el cultivo de cebolla en Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2(6): 971-978.
- Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR y Amador-Ramírez MD. 2013. Hortalizas y virosis en zacatecas: un patosistema complejo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4(8):1267-1277.

Vibrans H. and L. P. Tenorio. 2012. Malezas de México. Conabio. Versión 2012. Obtenido de la red: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm>.

Weilner S. and G. Bedlan. 2013. Detection of *Iris yellow spot virus* (IYSV) in selected *Allium* species and overwintering host in Austrian onion-producing areas. *Journal fur Kulturflanzen*. 65(2): 60-67.

Wisler G. C. and R. F. Norris. 2005. Interactions between weeds and cultivated plants as related to management of plant pathogens. *Weed Science*. 53(6): 914-917

CAPITULO III. VIRUS ASOCIADOS A ARVENSES EN CULTIVOS DE CEBOLLA DE MORELOS Y MICHOACÁN

3.1 RESUMEN

Las plantas no cultivadas son hospederos de virus que afectan a los cultivos, entre estos a la cebolla. El objetivo del presente trabajo fue detectar hospederos alternos a la cebolla de *Onion yellow dwarf virus*-OYDV, *Leek yellow stripe virus*-LYSV, *Tomato spotted wilt virus*-TSWV y/o *Groundnut bud necrosis virus*-GBNV en Morelos y Michoacán. Se realizaron muestreos en plantas no cultivadas en presencia del cultivo de la cebolla y en su ausencia. Las arvenses se analizaron por DAS-ELISA con antisueros específicos para los cuatro virus formando una muestra compuesta (parte baja, media y alta de la planta). Se analizaron un total de 190 muestras de plantas no cultivadas con y sin síntomas evidentes. *Tithonia diversifolia* y *Amaranthus hybridus* colectadas en Michoacán fueron positivos para OYDV. *Salvia gracilis* y *Chenopodium murale* de Michoacán y *A. hybridus*, *A. spinosus* y *Portulaca oleraceae* colectadas en Morelos fueron positivos para LYSV. Solo *A. hybridus*, *C. murale* y *A. spinosus* mostraron síntomas, el resto fueron asintomáticas. Solo *A. spinosus* y *A. hybridus* resultaron con una banda de 1.7 Kb después de realizar la RT-PCR con primers generales para *Potyvirus*. Esta información muestra el potencial de las plantas no cultivadas como reservorios de los principales virus que afectan al cultivo de la cebolla en Morelos y Michoacán.

Palabras clave adicionales: OYDV, LYSV, arvenses reservorios, *Potyvirus*.

3.2 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por virus son importantes y devastadores en el mundo en diferentes cultivos de interés económico (Bag *et al.*, 2012). El cultivo de la cebolla es afectada por una diversidad de géneros de virus (Lunello *et al.*, 2007), algunos con impacto en la calidad y producción del bulbo (Sevik, 2012). En México se tiene reportes de seis virus; *Onion yellow dwarf virus*, *Leek yellow stripe virus*, *Tomato spotted wilt virus*, *Tobacco etch virus*, *Iris yellow spot virus* y *Garlic latent common virus* (Velásquez-Valle *et al.*, 2010; Magos, 2011; Velásquez-Valle y Reveles-Hernández, 2011). Los *Potyvirus* es uno de los más grandes géneros de virus que causan enfermedades a diversas especies de plantas (Gibbs *et al.*, 2008) y son los responsables en causar severos daños a especies del género *Allium* como ajo y cebolla (Bag *et al.*, 2012).

Los virus además de estar en estrecha relación con su hospedante, también lo están con otras plantas secundarias como arvenses. Estas arvenses son importantes en la ecología del cultivo, ya que ante su ausencia se convierten en los principales hospedantes de los virus e insectos vectores (Hsu *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013), además de competir por nutrientes, energía solar, humedad y espacio (Sasthy y Zitter, 2014). Las enfermedades de tipo viral suele ser muy complejo debido a la interacción de varios factores, entre ellos a las arvenses que sirven como reservorios de éstos (Van Bogaert *et al.*, 2015) y pueden influir en el progreso de la epidemia viral (Chatzivassiliou, *et al.*, 2007).

3.3 OBJETIVO

- Detectar hospederos alternos de *Onion yellow dwarf virus*-OYDV, *Leek yellow stripe virus*-LYSV, *Tomato spotted wilt virus*-TSWV y/o *Groundnut bud necrosis virus*-GBNV en regiones productoras de cebollas de Morelos y Michoacán.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Colecta e identificación de arvenses

La colecta se realizó en los mismos municipios previamente ya mencionados en el capítulo anterior tomando plantas de arvenses en ausencia y presencia del cultivo. Los muestreos se realizaron durante el año 2015, dos muestreos en el estado de Michoacán y tres en el estado de Morelos. Se seleccionaron plantas con síntomas putativos a virosis y asintomáticas. Las muestras fueron previamente etiquetadas y almacenadas a 4 °C para su respectivo análisis.

La identificación de las arvenses se realizó con el apoyo de claves taxonómicas (Rzedowski *et al.*, 2001; Rzedowski *et al.*, 2005; Espinosa y Sarukhán, 1997; Vibrans y Tenorio, 2012) y la colaboración del M. C. Juan Carlos Delgado, especialista en arvenses de Guanajuato.

3.4.2 Detección de virus en arvenses

Se utilizó el método serológico DAS-ELISA con anticuerpos específicos para los virus de *Onion yellow dwarf virus*-OYDV, *Leek yellow stripe virus*-LYSV, *Tomato spotted wilt virus*-TSWV y *Groundnut bud necrosis virus*-GBNV, siguiendo las indicaciones del fabricante (Agdia®). Se analizaron por duplicado las muestras compuestas de cada planta colectada, consistentes en hojas de la parte baja, media y alta; se incluyó un control positivo y negativo de cada virus (Agdia®). La reacción se consideró positiva si el valor de absorbancia fue tres veces mayor a la media del control negativo (Sutula *et al.*, 1986).

3.4.3 Extracción de ARN total, síntesis de cDNA y amplificación por PCR

Extracción de ARN total

Las muestras arvenses positivas (OYDV y LYSV) se les realizó extracción de ARN total con el método de TRIzol® Reagent de acuerdo con las instrucciones del fabricante (life technologies™), tomando tejido de la misma hoja donde previamente se tomaron para el análisis por DAS-ELISA.

Síntesis de cDNA y amplificación por PCR

Se realizó la retrotranscripción de las muestras de arvenses positivas por DAS-ELISA. Se utilizó 500-1000ng de ARN de cada muestra, 10 µM de iniciador M4T (5' GTTTTCCCAGTCACGAC (T)₁₅ 3') (Chen *et al.*, 2001), buffer M-MLV (Promega®), DTT (DL-Dithiothreitol), dNTP's (10 µL) (Promega®) y la enzima reversa transcriptasa M-MLV

(Promega®), en un volumen final de 10 µL. La mezcla se incubó a 37 °C por 60 min y posteriormente 72 °C por 10 min.

Para la reacción de PCR se utilizó 2.5 µL de buffer PCR 5X, 1.25 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL dNTP's (10 mM), 1 µL por cada iniciador (10 mM), 0.4 µL de Taq polimerasa (5U/µL) y 2 µL de cDNA, en un volumen final de 25 µL. Los iniciadores que se utilizaron en la reacción de PCR fueron; M4 (5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3') y Sprimer (5' GGXAAYAAYAGYGGXCAZCC 3', X=A, G, C o T; Y=T o C; Z= A o G) (Chen *et al.*, 2001), bajo las siguientes condiciones: 94 °C por 1 min seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 47 °C por 1 min, 72 °C por 2 min y una extensión final de 72°C por 10 min. Los productos amplificados de 1.7 Kb se visualizaron en un gel de agarosa a 1 % con bromuro de etidio por medio de un fotodocumentador.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Colecta e identificación de arvenses

Se colectaron y analizaron un total de 190 plantas de arvenses, de las cuales 136 fueron de los municipios del estado de Morelos y solo 54 arvenses de Michoacán. Se identificaron 29 especies agrupadas en 11 familias en Morelos y 18 especies (nueve familias) en Michoacán (Cuadro 1). De las muestras colectadas en el estado de Morelos 92 arvenses fueron colectadas de las orillas de las parcelas y 44 arvenses colectadas dentro de las parcelas, en el caso de Michoacán 37 arvenses se colectaron de las orillas de la parcela y solo 17 dentro de las parcelas (Figura 1). Alrededor de 37 y 31 % de las plantas presentaron síntomas putativos de virus para Morelos y Michoacán, respectivamente.

Cuadro 1. Arvenses colectadas en presencia y ausencia del cultivo de cebolla en Morelos y Michoacán y resultado de la prueba de DAS-ELISA para *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Onion yellow dwarf virus* OYDV, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) y *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV).

Familia/especie	Plantas analizadas ELISA	Municipios de Morelos*Michoacán	Época de colecta de arvenses Morelos*Michoacán	LYSV	OYDV	TSWV	GBNV
Acanthaceae							
<i>Dicliptera peduncularis</i>	3	Ay/Ez	VO	-	-	-	-
Amaranthaceae							
<i>Amaranthus hybridus</i>	19	Ez/Ay*Vh/Ta	VO*O	Ay ₊₊	Vh ₊	-	-
<i>Amaranthus sp.</i>	2	Pi/Xo	V	-	-	-	-
<i>Amaranthus spinosus</i>	4	Ay/Ax	O	Ay ₊	-	-	-
Apiaceae							
<i>Spananthe paniculata</i>	1	Ez	O	-	-	-	-
Asteraceae							
<i>Aldama dentata</i>	1	Pi	V	-	-	-	-
<i>Bidens pilosa</i>	3	Ay	VO	-	-	-	-
<i>Flaveria trinervia</i>	3	Xo*Vh	V*O	-	-	-	-
<i>Galinsoga parviflora</i>	1	Vh	O	-	-	-	-
<i>Melampodium sp.</i>	2	Ay	VO	-	-	-	-
<i>Parthenium hysterophorus</i>	22	Pi/Ez/Xo/Ay*Vh/Ta	VO	-	-	-	-
<i>Sanvitalia procumbens</i>	3	Pi/Xo/Ay	VO	-	-	-	-

<i>Sonchus oleraceus</i>	4	Vh/Ta	O	-	-	-	-
<i>Tithonia diversifolia</i>	4	Vh	O	-	Vh ₊	-	-
<i>Tithonia tubiformis</i>	10	Pi/Ay/Ax*Vh	VO	-	-	-	-
<i>Verbesina crocata</i>	3	Pi/Ay	V	Pi ₊	-	-	-
Chenopodiaceae							
<i>Chenopodium album</i>	1	Ta	O	-	-	-	-
<i>Chenopodium murale</i>	3	Vh/Ta	O	Vh ₊₊	-	-	-
Commelinaceae							
<i>Tinantia erecta</i>	1	Ez	O	-	-	-	-
<i>Ipomoea batatas</i>	1	Ez	V	-	-	-	-
Convolvulaceae							
<i>Ipomoea purpurea</i>	3	Ez/Xo	VO	-	-	-	-
Euphorbiaceae							
<i>Acalypha arvensis</i>	9	Pi/Ez/Xo	VO	-	-	-	-
<i>Acalypha ostryifolia</i>	20	Pi/Ez/Ay/Ax*Ta	VO	-	-	-	-
<i>Euphorbia berteroaana</i>	2	Ez/Ay	V	-	-	-	-
<i>Euphorbia heterophylla</i>	1	Ax	O	-	-	-	-
<i>Euphorbia sp.</i>	1	Pi	V	-	-	-	-
<i>Ricinus communis</i>	24	Pi/Ez/Ay/Ax*Vh	VO	-	-	-	-
Lamiaceae							
<i>Salvia tiliifolia</i>	2	Vh/Ta	O	Vh ₊	-	-	-
Malvaceae							
<i>Anoda cristata</i>	4	Pi/Ay/Ax	VO	-	-	-	-
<i>Malva parviflora</i>	3	Vh/Ta	O	-	-	-	-
<i>Malvastrum bicuspidatum</i>	1	Ax	O	-	-	-	-
<i>Malvastrum coromandelianum</i>	7	Pi/AyAx	VO	-	-	-	-
Portulacaceae							
<i>Portulaca oleracea</i>	8	Pi/Ez/Ay*Vh/Ta	VO	Pi,Ay ₊	-	-	-
Solanaceae							
<i>Capsicum annum</i>	3	Pi*Vh	V*O	-	-	-	-
<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	Ta	O	-	-	-	-
<i>Physalis ixocarpa</i>	2	Vh	O	-	-	-	-
<i>Solanum nigrum</i>	2	Vh	O	-	-	-	-
<i>Solanum rostratum</i>	1	Pi	V	-	-	-	-
Vitaceae							
<i>Vitis vinifera</i>	1	Ta	O	-	-	-	-
Zygophyllaceae							
<i>Kallstroemia rosei</i>	4	Pi/Xo/Ax	VO	-	-	-	-

Ay: Ayala, Mor.; Xo: Xochitepec, Mor.; Jo: Jojutla, Mor.; Pi: Puente de Ixtla, Mor.; Ez: Emiliano Zapata, Mor. Ax: Axochiapan, Mor.; Za: Zacatepec, Mor.; Vh: Vista Hermosa, Mich.; Ta: Tanhuato, Mich.; V: verano; O: Otoño. + Planta positiva para el virus.

++ Dos plantas positivas para el virus

De las muestras de arvenses colectadas en Morelos 108 muestras fueron colectadas en ausencia del cultivo de la cebolla y solo 28 se colectaron en presencia de cultivo. En el caso del estado de Michoacán solo fueron 24 muestras en ausencia y 30

arvenses en presencia del cultivo. Las familias Euphorbiaceae, Asteraceae, Malvaceae y Amaranthaceae fueron más abundantes en Morelos y en el estado de Michoacán solo las familias Asteraceae y Amaranthaceae pero en menor número de especies.

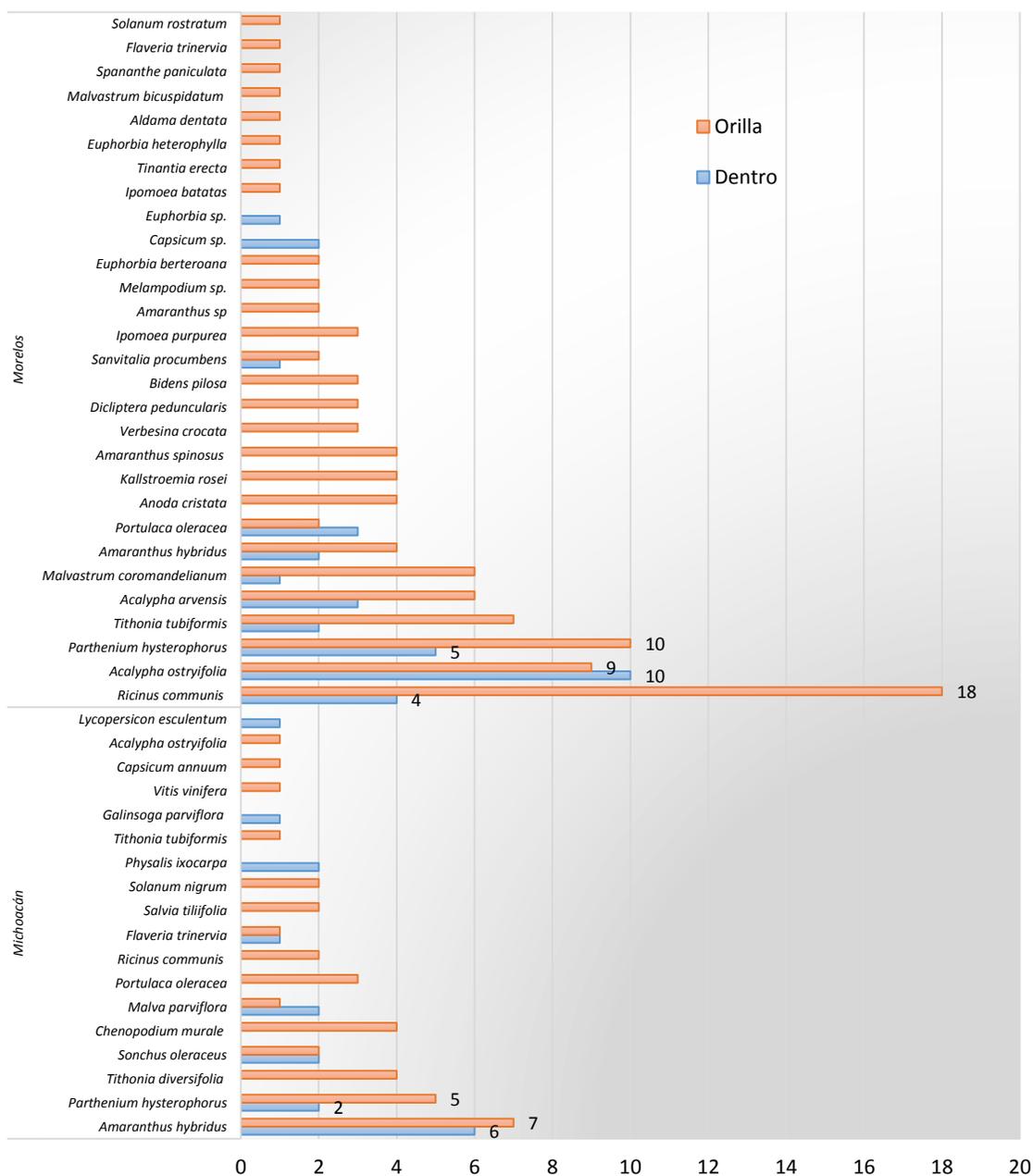


Figura 1. Distribución de frecuencias de especies de arvenses analizadas para los virus OYDV, LYSV, TSWV y GBNV por DAS-ELISA en los estados de Morelos y Michoacán.

3.5.2 Detección de virus en arvenses

Del total de muestras analizadas solo *T. diversifolia* y *A. hybridus* colectadas en la orilla del cultivo de las parcelas de Michoacán fueron positivas para OYDV (Cuadro 1). *Tithonia diversifolia* (planta bianual) se localizó de forma asintomática en las parcelas del municipio de Vista Hermosa de manera constante, así como a *A. hybridus*. En el caso de *A. hybridus* mostró síntomas como deformación foliar, ligero amarillamiento y lesiones color pajizo rodeado por un halo rojizo-púrpura (Figura 2).

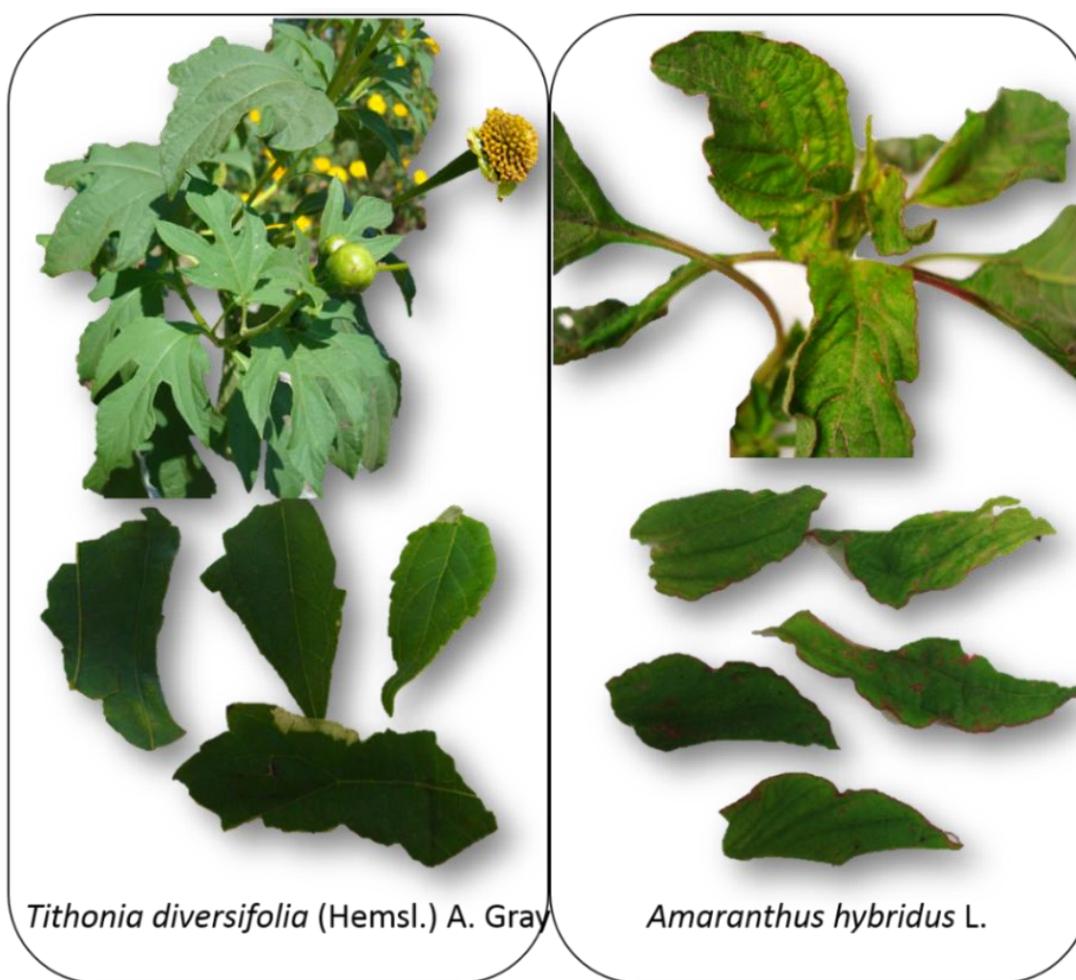


Figura 2. Muestras de arvenses del estado de Michoacán positivas para *Onion yellow dwarf virus*.

Para el virus *Leek yellow spot virus* fue detectado en seis muestras de arvenses colectadas en Morelos, *P. oleraceae*, *V. crocata*, *A. hybridus* y *A. spinosus*, así como *S. tiliifolia* y *C. murale* colectadas en Michoacán (Figura 3). Tanto *A. hybridus* y *A. spinosus* mostraron ligera deformación de las hojas, manchas de color pajizo bordeado por un halo ligeramente rojizo (Figura 4). Estos síntomas fueron similares en *A. hybridus* positivo para OYDV, con la diferencia que el síntoma del halo color rojizo fue más evidente.

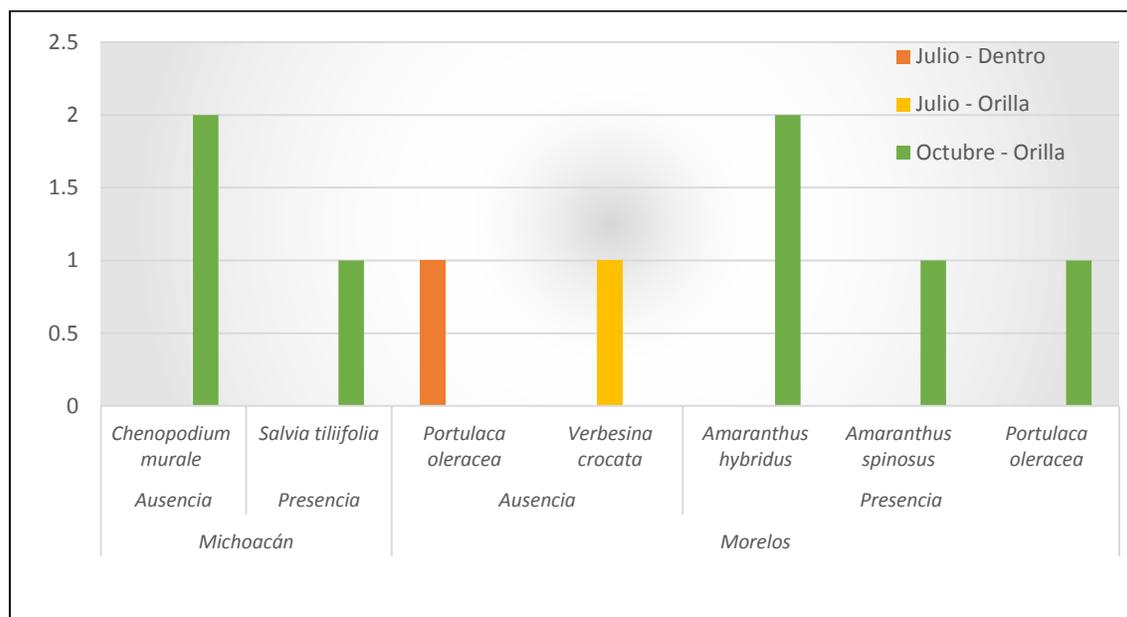


Figura 3. Especies de arvenses positivas para LYSV por DAS-ELISA en los estados de Morelos y Michoacán.

Para *C. murale* solo se observó pequeñas manchas cloróticas en las algunas hojas de la planta (Figura 4). Todas las arvenses positivas para los dos virus fueron colectadas de las orillas de las parcelas, a excepción de una muestra de *P. oleracea* que se colectó dentro de la parcela. Para el caso de TSWV y GBNV ninguna muestra de arvense fue positiva por DAS-ELISA.



Figura 4. Síntomas de las arvenses positivas para *Leek yellow spot virus* por DAS-ELISA colectadas del estado de Morelos y Michoacán.

3.5.3 Extracción de ARN total, síntesis de cDNA y amplificación por PCR

En las muestras positivas mediante DAS-ELISA, solo *Amaranthus hybridus* y *Amaranthus spinosus* amplificaron la banda esperada de 1.7 Kb para el género *Potyvirus* mediante RT-PCR (Figura 5).

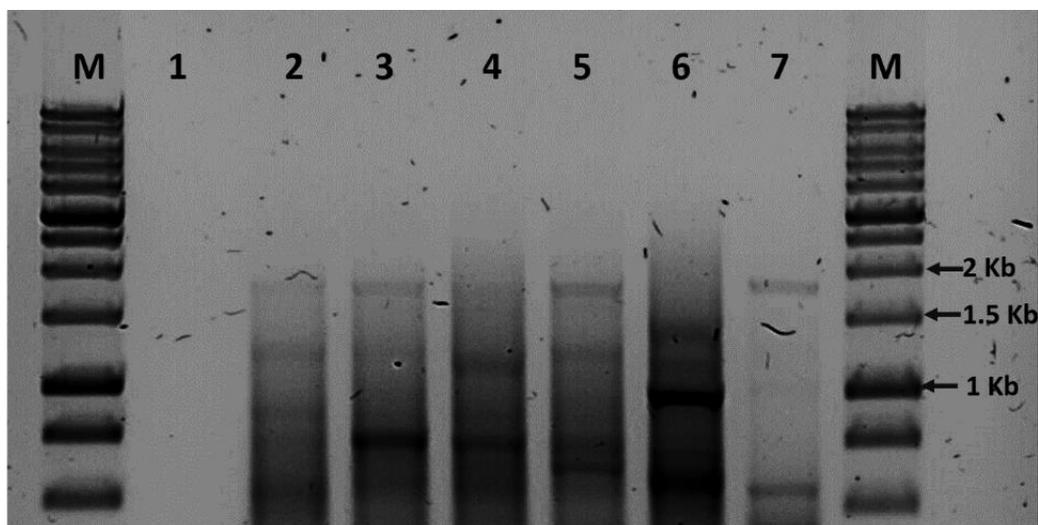


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la RT-PCR del género *Potyvirus* en arvenses. **M:** marcador molecular de 1 Kb; carril **1:** Control negativo (agua); carriles **2-4:** *A. hybridus*; carril **5:** *A. spinosus*; carril **6:** *P. oleracea* y carril **7:** Control positivo para *Potyvirus* de 1.7 Kb.

3.6 DISCUSIÓN

Se observó una amplia diversidad de arvenses dentro y fuera de las parcelas interactuando junto con el cultivo de cebolla, estas arvenses se congregaron en 40 especies, de las cuales algunas especies se han reportado como reservorios de virus e insectos vectores de virus (Macharia *et al.*, 2016).

De los virus estudiados, se detectó algunas arvenses positivas para OYDV y LYSV (*Potyvirus*) por DAS-ELISA y no así para TSWV y GBNV (*Tospovirus*). En el caso de OYDV es un virus que está limitado a especies del género *Allium* como cebolla y ajo (Davis y Aegerter, 2010). No obstante, se detectó en las arvenses *T. diversifolia* (Asteraceae) y *A. hybridus* (Amaranthaceae) positivos para OYDV. Dichas muestras

fueron colectadas de la orilla de las parcelas del estado de Michoacán. Estos datos no concuerdan con Kumar *et al.* (2009) quienes realizaron transmisión mecánica del virus en diversas especies de plantas pertenecientes a 12 familias y ninguna mostró síntomas a excepción de especies del género *Allium*. Por otro lado, Mahmoud *et al.* (2008) mencionan que el virus no solo puede infectar a plantas de la familia *Alliaceae* también a la familia *Chenopodiaceae*, donde observaron síntomas por transmisión mecánica en *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* y *C. album*. A pesar de la poca información que se tiene del limitado rango de hospedantes del virus, en este trabajo se demuestra que no solo puede infectar a especies del género *Allium*, sino a otras especies, ampliando el rango de hospedantes. Por otro lado cabe la posibilidad de que el virus presente en las áreas de estudio sea más agresivos, por lo que sería adecuado hacer estudios con mayor profundidad.

Para el caso LYSV, se detectó en cuatro especies de arvenses con presencia de este virus localizados en Morelos, *P. oleraceae*, *V. crocata*, *A. hybridus* y *A. spinosus*, así como *S. tiliifolia* y *C. murale* colectadas en Michoacán. Hasta el momento no se tiene registro de LYSV infectando de forma natural a otras especies diferentes de la familia *Alliaceae*; sin embargo, Lunello *et al.* (2002) reportó lesiones locales cloróticas en *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa* inoculados mecánicamente. Estos mismos síntomas se observaron en *C. murale*, el cual resultó positivo para LYSV, no así para el resto de las arvenses donde unas fueron asintomáticas y otras mostraron síntomas diferentes.

Tanto OYDV y LYSV son dos virus del género *Potyvirus*, los cuales son transmitidos por una diversidad de áfidos (Gibbs *et al.*, 2008). Pese que en nuestro estudio solo se encontraron en algunas plantas la presencia de áfidos, no se encontró en las plantas que resultaron positivas, lo que nos sugiere otras formas de transmisión del virus en las plantas arvenses, o bien que el insecto virulífero solo realizó pruebas de alimentación en plantas sanas (Gibbs *et al.*, 2008) transmitiendo el virus en las arvenses.

Se tiene una limitada información de la relación entre virus, vector y arvenses (Chen *et al.*, 2013), por lo que sería de primordial importancia conocer dichas relaciones con la finalidad de ampliar el conocimiento de los factores que influyen en la epidemia viral de estos virus en el cultivo. Por otro lado, el conocer la relación que se tiene del virus-vector puede variar dependiendo del efecto del virus en su vector al ser nocivo, neutral o benéfico (Chen *et al.*, 2013). Por lo que también sería importante hacer estudios de los vectores presentes en el área de estudio para conocer el papel que juegan los vectores de estos virus.

Sin bien se tiene reportes que OYDV y LYSV en los cultivos de importancia como el ajo y la cebolla, se tienen un limitado conocimiento del rango de hospedantes, por lo que hace falta un estudio más profundo de las arvenses que interaccionan con el hospedante principal, en este caso el cultivo de la cebolla.

Pese que los resultados mostraron ocho arvenses positivas para ambos virus, solo *A. hybridus* y *A. spinosus* amplificaron la banda deseada para *Potyvirus*. Estos resultados

podieron ser influenciados por varios factores, como la dificultad de extracción de ARN del tejido vegetal de arvenses con alto contenido de sustancias que limitan el proceso de RT-PCR, el tiempo de colecta del tejido a la extracción del ARN, la selección del tejido con zonas enfermas, entre otras.

El pesar de su limitado rango de hospedantes de estos virus, y de las arvenses que resultaron positivas, bien se puede tener un mejor control de los hospedantes alternativos (Sastry y Zitter, 2014). Nuestro estudio muestra la importancia que pueden tener las arvenses al servir como reservorios de virus. Del cual la importancia de estudiar de como las arvenses adquieren los virus y si son fuente de transmisión para nuevas plantaciones de cebolla. Ante ello es importante continuar estudiando específicamente las especies de arvenses positivas en este estudio con el fin de aseverar mediante otros métodos moleculares y pruebas biológicas la presencia del virus y el papel que juega en la epidemiología del virus en el cultivo de la cebolla.

3.7 CONCLUSIÓN

- Las arvenses *T. diversifolia* y *A. hybridus* colectadas en el estado de Michoacán fueron positivas para el virus *Onion yellow dwarf virus*.
- Se detectó *P. oleraceae*, *V. crocata*, *A. hybridus* y *A. spinosus* de Morelos, así como *S. tiliifolia* y *C. murale* colectadas en Michoacán positivas para *Leek yellow spot virus*.
- Ninguna arvense salió positiva para TSWV y GBNV.

3.8 LITERATURA CITADA

- Bagi F., V. Stojšin, D. Budakov, S. M. A. El Swaeh and J. Gvozdanović-Varga. 2012. Effect of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) on yield components of fall garlic (*Allium sativum* L.) in Serbia. *African Journal of Agricultural Research* 7(15): 2386-2390.
- Chatzivassiliou E.K., D. Peters, and N. I. Katis. 2007. The Role of weeds in the spread of *Tomato spotted wilt virus* by *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in Tobacco crops. *Journal Phytopathology*. 1-7 p.
- Chen J., Chen J., and Adams M. J. 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.
- Chen G., Pan H., Xie W., Wang S., Wu Q., Fang Y., Shi X., and Zhang Y. 2013. Virus infection of a weed increases vector attraction to and vector fitness on the weed. *Scientific Reports*. 3: 1-6.
- Davis R. M., and B. J. Aegerter. 2010. Pest management guidelines: Onion/Garlic. IPM, Pest Management Guidelines. University of California Agriculture and Natural Resources. Oakland, CA. pp 12-26.
- Espinosa F., J. y J. Sarukhán, 1997. Manual de Malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica, México, D. F.

- Gibbs A. J., K. Ohshima, M. J. Phillips and M. J. Bibbs. 2008. The prehistory of Potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. PLoS ONE. 3(6): 1-11.
- Hsu C. L., C. A. Hoepting, M. Fuchs, E. A. Smith and B. A. Nault. 2011. Sources of *Iris yellow spot virus* in New York. Plant Disease. 95:735-743.
- Kumar P., R. Mehra and P. Dhawan. 2009. Biological and serological diagnosis of *Onion yellow dwarf virus*. Journal Horticulture Science. 38 (3&4): 300-305.
- Lunello P., J. Di Rienzo and V. C. Conci. 2007. Yield loss in garlic caused by *Leek yellow stripe virus* Argentinean isolate. Plant Disease. 91:153-158.
- Macharia I., D. Backhouse, S.-B. Wu and E. M. Ateka. 2016. Weed species in tomato production and their role as alternate hosts of *Tomato spotted wilt virus* and its vector *Frankliniella occidentalis*. Annuals of Applied Biology. 1-12 pp.
- Magos G., K. 2011. Trips y virus asociados a cebolla (*Allium cepa* L.), su efecto en el rendimiento en Atlacholoaya, Morelos. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 67 p.
- Mahmoud S. Y. M., S. A. Abo-El Maaty, A. M. El-Borollosy and M. H. Abdel-Ghaffar. 2008. Identification of *Onion yellow dwarf Potyvirus* as one of the major viruses infecting garlic in Egypt. International Journal of virology. 4(1):1-13.

- Rzedowski G. C. de y J. Rzedowski. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Rzedowski G. C. de y J. Rzedowski. 2005. Manual de malezas de la región de Salvatierra, Guanajuato. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo complementario XX. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz. 315 p.
- Sastry K. S. 2013. Plant virus and viroid diseases in the tropics. Vol 1. Introduction of plant viruses and sub-viral agent, classification, assessment of loss, transmission and diagnosis. Springer Science. New York. 361 p.
- Sastry K. S. and Zitter T. A. 2014. Plant virus and viroid diseases in the tropics. Volume 2. Epidemiology and management. Springer. New York. 489 p.
- Sevik M. A. 2012. Determination of *Onion yellow dwarf virus* concentration levels on onion bulb and leaf by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). Archives of Phytopathology and Plant Protection. 45 (3): 339-343.
- Sutula C. L., J. M. Gillett, S. M. Morrissey and D. C. Ramsdell. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. Plant Disease. 70 (8): 722-726.
- Van Bogaert N., G. Smagghe and K. de Jonghe. 2015. The role of weeds in the epidemiology of pospiviroids. Weed Research 55: 631-638.

Velásquez-Valle R. y Reveles-Hernández M. 2011. Velásquez V. R. y H. M. Reveles. 2011. Detección del *Iris yellow spot virus* en el cultivo de cebolla en Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2(6): 971-978.

Velásquez-Valle R., Y. I. Chew-Madinaveitia, M. D. Amador-Ramírez y M. Reveles-Hernández. 2010. Presencia de virus en el cultivo de ajo (*Allium cepa* L.) en Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28(2): 135-142.

Vibrans H. and L. P. Tenorio. 2012. Malezas de México. Conabio. Versión 2012. Obtenido de la red: <http://www.conabio.gob.mx>.