

Variability and symptoms caused by *Iris yellow spot virus* in *Nicotiana benthamiana*

Variabilidad y síntomas causados por *Iris yellow spot virus* en *Nicotiana benthamiana*

Katya Ornelas-Ocampo, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez*, Sergio Aranda-Ocampo, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México; **Sergio Ramírez-Rojas**, Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. Km. 0.5 carretera Zacatepec-Galeana, C.P. 62780, Colonia Centro Zacatepec, Morelos; **Hernán García-Ruíz**, Department of Plant Pathology and Nebraska Center for Virology, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE, USA. *Autor para correspondencia: ldaniel@colpos.mx.

Recibido: 13 de Julio, 2017.

Aceptado: 05 de Octubre, 2017.

Ornelas-Ocampo K, Ochoa-Martínez DL, Aranda-Ocampo S, Ramírez-Rojas S, García-Ruíz H. 2017. Variability and symptoms caused by *Iris yellow spot virus* in *Nicotiana benthamiana*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 131-140.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1707-2

Primera publicación DOI: 18 de Octubre, 2017.

First DOI publication: October 18, 2017.

Resumen. En cultivos de cebolla *Allium cepa* del estado de Morelos, México, se observan síntomas típicos y severos asociados a *Iris yellow spot virus* (IYSV). En esta investigación se estudiaron las alteraciones que ocasionan los aislamientos de IYSV procedentes de síntomas típicos y severos en *Nicotiana benthamiana*, las diferencias en el gen N y su filogenia. Cuatro aislamientos típicos y

Abstract. In onion *Allium cepa* crops in the state of Morelos, Mexico, typical and severe symptoms associated with *Iris yellow spot virus* (IYSV) are observed. In this work the alterations caused by IYSV isolates from typical and severe symptoms in *Nicotiana benthamiana*, the differences in the N gene and their phylogeny were studied. Four typical and five severe isolates mechanically inoculated caused systemic infection. Severe isolates caused more severe symptoms in bioclimatic chamber. The N gene sequence of both isolates had 98-99% identity with the IYSV nucleoprotein and no changes in nucleotide sequence between them were observed. Both isolates were grouped with the IYSV_{BR} genotype and had greater similarity with those reported in Canada and the United States.

Key words: *Tospovirus*, phylogeny, genomic changes.

cinco severos inoculados mecánicamente causaron infección sistémica. En cámara bioclimática los aislamientos severos ocasionaron mayor severidad de síntomas. La secuencia del gen N de ambos aislamientos tuvo 98-99% de identidad con la nucleoproteína de IYSV y no se observaron cambios en la secuencia de nucleótidos entre ellos. Ambos aislamientos se agruparon con el genotipo IYSV_{BR} y tuvieron mayor similitud con los reportados en Canadá y Estados Unidos.

Palabras clave: *Tospovirus*, filogenia, cambios genómicos.

La enfermedad viral más importante del cultivo de cebolla *Allium cepa* es la mancha amarilla causada por *Iris yellow spot virus* (IYSV) (Bunyaviridae:Tospovirus) (Kritzman *et al.*, 2001) ya que ocasiona una importante disminución del tamaño del bulbo (Gent *et al.*, 2004). En hojas y tallos florales de cebolla el IYSV ocasiona manchas cloróticas de forma alargada o de diamante, color pajizo y aspecto seco, con ausencia o presencia de islas verdes en el centro de las lesiones (Gent *et al.*, 2006). El genoma de IYSV consiste de tres segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo denominados grande (L), mediano (M) y pequeño (S) (Bag *et al.*, 2009; Bag *et al.*, 2010). El segmento S contiene al gen N que codifica para la nucleoproteína de la cápside comúnmente utilizado para la identificación y clasificación de tospovirus debido a su grado de divergencia (Pappu *et al.*, 2006), además de estudios de distribución geográfica y diversidad genética (Iftikhar *et al.*, 2014). Este virus se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial (Gent *et al.*, 2006) y en México ha sido reportado desde 2012 en cultivos de cebolla del estado de Morelos causando la enfermedad conocida como “mancha amarilla” con una

The most important viral disease that affects onion crops (*Allium cepa*) is yellow spot caused by the *Iris yellow spot virus* (IYSV) (Bunyaviridae:Tospovirus) (Kritzman *et al.*, 2001), because it leads to major reductions in bulb size (Gent *et al.*, 2004). Symptoms of IYSV on onion leaves and flower stems appear as elongated or diamond-shaped straw colored and dry-looking chlorotic spots, with or without green areas in the middle of the lesions (Gent *et al.*, 2006). The IYSV genome consists of three negative-sense, single-strand RNA segments defined as large (L), medium (M) and small (S) (Bag *et al.*, 2009, 2010). The S segment contains the N gene that encodes for capsid nucleoprotein that is commonly used to identify and classify tospoviruses, because of its degree of divergence (Pappu *et al.*, 2006), as well as to study geographic distribution and genetic diversity (Iftikhar *et al.*, 2014). IYSV is widely distributed worldwide (Gent *et al.*, 2006) but in Mexico it has been reported since 2012 on onion crops in the state of Morelos, where it causes a disease known as “yellow spot” with 100% incidence and more than 90% severity (Ramírez *et al.*, 2016). In Morelos, two types of symptoms associated with IYSV have been observed and, for this reason, the objective of this research was to describe the symptoms caused by both isolates on *Nicotiana benthamiana*, and to find out if there are differences in the N segment of the genome and its phylogenetic relation with other isolates. In the 2014-2015 cycle, onion plants showing symptoms of “yellow spot” associated with IYSV were collected in the municipalities of Ayala, Axochiapan, Emiliano Zapata, Jojutla, Puente de Ixtla, Tlaquiltenango, Xochitepec and Zacatepec in the state of Morelos, Mexico. Onion leaf tissue was classified based on the severity of the symptoms observed, frozen with liquid nitrogen and stored at -80 °C. *Nicotiana benthamiana* plants were mechanically inoculated (Mandal *et al.*,

incidencia de 100% y severidad superior al 90% (Ramírez *et al.*, 2016). En esta entidad se han observado dos tipos de síntomas asociados a IYSV por lo que la presente investigación tuvo como objetivo describir los síntomas que ocasionan ambos aislamientos en *Nicotiana benthamiana*, conocer si hay diferencias en el segmento N del genoma y su relación filogenética con otros aislamientos. En el ciclo 2014-2015 se colectaron plantas de cebolla en los municipios de Ayala, Axochiapan, Emiliano Zapata, Jojutla, Puente de Ixtla, Tlaquiltenango, Xochitepec y Zacatepec en el estado de Morelos, México, con síntomas de “mancha amarilla” asociados a IYSV. El tejido foliar de cebolla se clasificó de acuerdo con la severidad de los síntomas observados, se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Se inocularon mecánicamente (Mandal *et al.*, 2006) plantas de *N. benthamiana* con tejido foliar de cebolla positivo para *Iris yellow spot virus* por RT-PCR que mostraron síntomas típicos o severos. Como control negativo se utilizaron dos plantas de *N. benthamiana* frotadas únicamente con el amortiguador y el carborundum. Un grupo de cinco plantas inoculadas con cada uno de los aislamientos típicos o severos se mantuvieron en cámara bioclimática (temperatura media de 25 °C, 91% de humedad relativa (HR) promedio, 77% de HR mínima y 99% de HR máxima; con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad) y otro grupo de plantas en invernadero (temperatura promedio de 25 °C, mínima y máxima de 13 y 39 °C, respectivamente; 50% de HR promedio, 27 y 71%, mínima y máxima, respectivamente). Las plantas se observaron cada tercer día durante tres semanas para registrar el período de incubación y tipo de síntomas. Se extrajo ARN total a partir 0.1 g de tejido foliar de plantas de cebolla colectadas en campo que presentaban síntomas asociados a IYSV y a partir de 0.25 g de hojas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente, en este último

2006) with onion leaf tissue that tested positive for *Iris yellow spot virus* using RT-PCR and showed typical or severe symptoms. Two *N. benthamiana* plants were used as negative controls, but they were only rubbed with a buffer and carborundum (silicon carbide). A group of five plants were inoculated with each of the typical or severe isolates and kept in a bioclimatic chamber at 25 °C average temperature and 91% average relative humidity (RH), 77% minimum RH and 99% maximum RH, and a photoperiod of 16 h light and 8 h darkness. Another group of plants was kept in the greenhouse at 25 °C average temperature (13 °C and 39 °C minimum and maximum temperature, respectively) and 50% average RH (27% and 71%, minimum and maximum HR, respectively). The plants were observed every other day for three weeks to record the incubation period and type of symptoms. Total RNA was extracted from 0.1 g of leaf tissue of onions plants collected in the field that showed symptoms associated with IYSV, and from 0.25 g of mechanically inoculated *N. benthamiana* leaves; RNA was extracted from the latter 10, 15 and 20 days post inoculation (dpi) with TriReagent® (Ambion®), following the manufacturer's protocol. The concentration and quality of the RNA was determined using a Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Inc), and its integrity through electrophoresis on 1% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml). The cDNA synthesis was performed using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega®), according to the manufacturer's instructions. Primers IYSV917L and IYSV56U were selected to detect IYSV on onion because they amplify a segment of 896 bp corresponding to the N gene (Robène *et al.*, 2006). A region of ribosomal gene 18S was amplified as control for the PCR reaction (Zamboni *et al.*, 2008). To determine whether there were differences in the nucleotide sequence between the two IYSV isolates

caso, a los 10, 15 y 20 días post-inoculación (dpi) con TriReagent® (Ambion®) siguiendo el protocolo del fabricante. Se determinó la concentración y calidad del ARN en un Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Inc) y su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). La síntesis de cDNA se realizó con M-MLV Reverse Transcriptase (Promega®) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La detección de IYSV en cebolla se realizó con los iniciadores IYSV917L e IYSV56U que amplifican un segmento de 896 pb correspondiente al gen N (Robène *et al.*, 2006). Como control de la reacción de PCR se amplificó una región del gen ribosomal 18S (Zamboni *et al.*, 2008). Con el propósito de determinar si existían diferencias en la secuencia de nucleótidos entre ambos aislamientos de IYSV inoculados en *N. benthamiana*, se diseñaron los iniciadores IYSV-KO4 (5'-CTTAACTAACACAAATACTG-3') e IYSV-KO6 (5'-AGAGCAATCGAGGTATAAAAC-3') para amplificar el gen N con el programa Vector NTI™ Suite 8.0 con base en la secuencia AF001387 de IYSV depositada en el GenBank. Las secuencias obtenidas fueron editadas con los programas Chromas Lite 2.0 y Vector NTI™ Suite 8.0 y depositadas en la base de datos del GenBank (KX434621-434623, KX443600-443604, KX443598 y KX443599). El alineamiento múltiple se llevó a cabo con ClustalW y el análisis filogenético se realizó por el método Neighbor-joining (2000 repeticiones) con el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Se colectaron 78 plantas de cebolla que mostraron síntomas de “mancha amarilla” asociados a IYSV en 14 localidades de los ocho municipios muestreados. Las plantas colectadas fueron de seis variedades de cebolla: Stratus (33.3%), Carta Blanca (24.4%), Florentina (10.2%), Cirrus (6.4%), Cal 214 (6.4%) y Joya (2.6%); el 16.7% restante de las muestras no fue posible identificar la variedad. Las plantas se

inoculated into *N. benthamiana*, primers IYSV-KO4 (5'-CTTAACTAACACAAATACTG-3') and IYSV-KO6 (5'-AGAGCAATCGAGGTATAAAAC-3') were designed to amplify the N gene using the Vector NTI™ Suite 8.0 program and based on the AF001387 sequence of IYSV stored in the GenBank. The obtained sequences were edited with the Chromas Lite 2.0 and Vector NTI™ Suite 8.0 programs and deposited in the GenBank database (KX434621-434623, KX443600-443604, KX443598 and KX443599). Multiple alignment was performed with the ClustalW program, and the phylogenetic analysis following the Neighbor-joining method (2000 replications) by using the MEGA6 program (Tamura *et al.*, 2013). Seventy-eight onion plants showing “yellow spot” symptoms associated with IYSV were collected at 14 sites of the eight sampled municipalities. The collected plants belonged to six onion varieties: Stratus (33.3%), Carta Blanca (24.4%), Florentina (10.2%), Cirrus (6.4%), Cal 214 (6.4%) and Joya (2.6%); it was not possible to identify the variety of the remaining 16.7% of samples. The plants were divided into two groups according to the symptoms they showed: a) typical symptoms in the form of elongated yellow-to-whitish dry spots with a chlorotic halo (Figura 1B), and b) severe symptoms consisting of white to yellow elongated and dry-looking spots with or without a necrotic halo, that in most cases covered the leaf (Figura 1C). Four typical isolates and five severe isolates were selected for analysis.

Primers IYSV917L and IYSV56U amplified the expected fragment of ~ 900 bp in all the typical isolates, while in the case of severe isolates the amplicon was ~500 bp (Figure 1D). However, both shared 99% identity with the capsid nucleoprotein of the N segment of IYSV reported in the GenBank. These results show that the 900 and 500 bp amplicons are associated with typical

dividieron en dos grupos con base en los síntomas que mostraban: a) síntomas típicos, consistentes en manchas secas amarillas a blanquecinas con halo clorótico y forma alargada (Figura 1B) y b) síntomas severos, en los cuales se observaban manchas blancas con o sin halo clorótico, alargadas, de aspecto seco que en muchos casos cubrían la lámina foliar (Figura 1C). Se seleccionaron cuatro aislamientos típicos y cinco aislamientos severos para su análisis.

Los iniciadores IYSV917L e IYSV56U amplificaron el fragmento esperado de ~ 900 pb en todos los aislamientos típicos, mientras que en el caso de los aislamientos severos se tuvo un amplicón de ~500 pb (Figura 1D) y ambos tuvieron 99% de identidad con la nucleoproteína de la cápside del segmento N de IYSV reportadas en el GenBank. Estos resultados muestran que los amplicones de 900 y 500 pb están asociados a aislamientos típicos o severos de IYSV, respectivamente. La severidad de los síntomas ocasionados por los aislamientos típicos y severos de IYSV en *N. benthamiana* fue diferente según la condición ambiental en la que se mantuvieron las plantas después de la inoculación

or severe IYSV isolates, respectively. The severity of the symptoms induced by typical and severe IYSV isolates on *N. benthamiana* was different depending on the environmental conditions under which the plants were kept after inoculation, regardless of the inoculum source. When kept in a bioclimatic chamber, at 7 dpi the symptoms induced by four of the five severe isolates were systemic and consisted of necrotic leaf venation, petiole constriction, necrotic leaf lesions surrounded by a dark brown halo, chlorosis and wilting. At 22 dpi, severe wilting was observed similar to that reported by Bag *et al.* (2012) (Figure 2B). In the case of the typical isolates, one produced chlorotic and necrotic lesions with necrotic veins and petioles; two more produced chlorotic and necrotic lesions but did not affect veins and petioles; the fourth isolate did not induce symptoms. On the other hand, when kept in the greenhouse, four severe and two typical isolates produced systemic infection at 10 dpi in the form of chlorosis and leaf wrinkling. One typical and one severe isolate caused more necrotic lesions on the leaves (Figure 2B). The fact that not all the typical or severe isolates caused the same symptoms (or

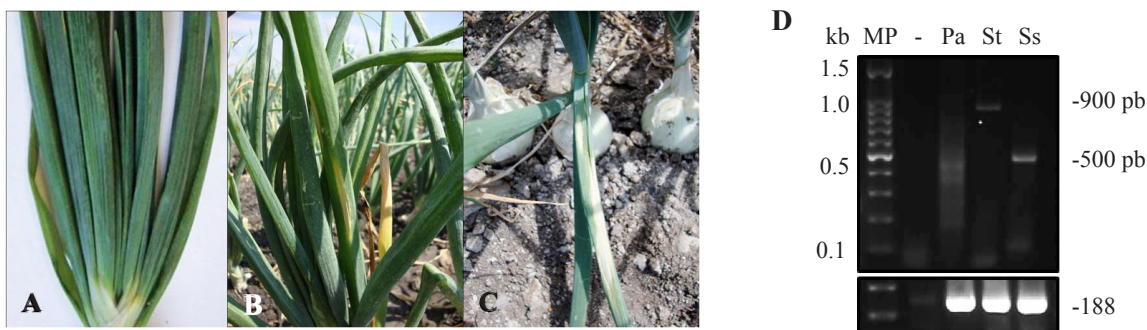


Figura 1. Síntomas asociados a *Iris yellow spot virus* en cebolla. A. Planta asintomática (Pa). B. Síntoma típico (St). C. Síntoma severo (Ss). D. Productos de PCR obtenidos con los iniciadores IYSV917L e IYSV56U que amplifican un segmento del gen N de IYSV. -: control negativo. MP: Marcador de peso molecular 100 pb.

Figure 1. Symptoms associated with *Iris yellow spot virus* in onion. A. Asymptomatic plant (Pa). B. Typical symptom (St). C. Severe symptom (Ss). D. PCR products obtained using the IYSV917L and IYSV56U primers that amplify a segment of the N gen of IYSV. -: negative control. MP: 100 pb molecular weight marker.

independientemente de la fuente de inóculo. En cámara bioclimática, a los 7 dpi los síntomas ocasionados por cuatro de los cinco aislamientos severos fueron sistémicos, consistentes en necrosis de nervaduras, constricción de peciolas, lesiones necróticas foliares rodeadas por un halo café oscuro, clorosis y marchitamiento. A los 22 dpi se observó una marchitez severa similar a la reportada por Bag *et al.* (2012) (Figura 2B). En el caso de los

that some did not even cause visible alterations) during that evaluation period can be attributed to the mechanical inoculation process, because it is known that the mechanical transmission of IYSV is difficult (Bag and Pappu, 2009). In spite of the inconsistency of the first symptoms observed, in the greenhouse all the inoculated plants showed wilting at 30-35 dpi regardless of the isolate. On the other hand, in a study using *Tobacco mosaic virus* strains

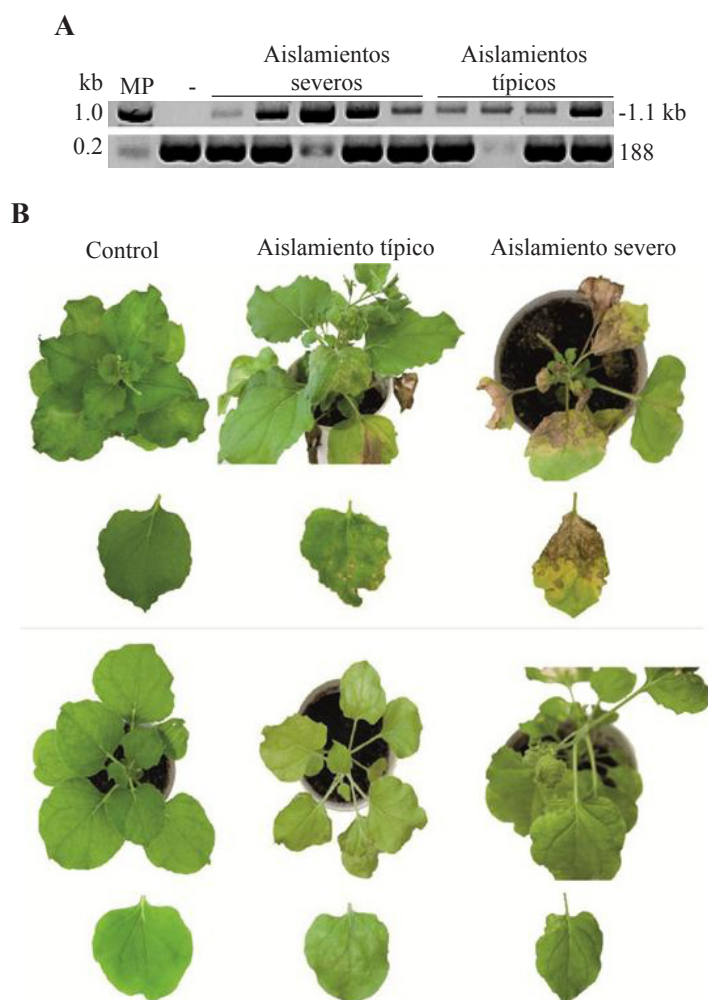


Figura 2. A. Productos de PCR obtenidos con los iniciadores IYSV-KO4 e IYSV-KO6 que amplifican el gen N + UTR5' provenientes de aislamientos típicos y severos de IYSV. MP: Marcador de peso molecular 1 kb (Promega), -: control negativo planta asintomática. B. Síntomas en plantas y hojas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente con dos aislamientos de *Iris yellow spot virus* mantenidas en dos condiciones ambientales.

Figure 2. Figure 2. A. PCR products obtained using the IYSV-KO4 and IYSV-KO6 primers that amplify the N + UTR5' gen from typical and severe IYSV isolates. MP: Molecular weight marker 1 kb (Promega), -: negative control asymptomatic plant. B. Symptoms in *N. benthamiana* plants and leaves mechanically inoculated with two *Iris yellow spot virus* isolates kept under two environmental conditions.

asilamientos típicos, uno ocasionó lesiones cloróticas y necróticas con necrosis de venas y peciolo, dos más causaron lesiones cloróticas y necróticas sin la afectación de venas y peciolo; el cuarto aislamiento no ocasionó síntomas. Por otro lado, en invernadero cuatro aislamientos severos y dos típicos ocasionaron una infección sistémica a los 10 dpi consistente en clorosis y arrugamiento de hojas. Un aislamiento típico y uno severo causaron más lesiones cloróticas en las hojas (Figura 2B). El hecho de que no todos los aislamientos típicos o severos produjeran los mismos síntomas (o incluso que alguno no causara alteraciones visibles) en esta fecha de evaluación puede atribuirse al proceso de inoculación mecánica pues se sabe que existen problemas para la transmisión mecánica de IYSV (Bag y Pappu, 2009). A pesar de la inconsistencia en los síntomas iniciales observados, en invernadero todas las plantas inoculadas mostraron marchitez a los 30-35 dpi independientemente del aislamiento. Por otro lado, en un estudio realizado con variantes de *Tobacco mosaic virus* inoculadas en *Nicotiana tabacum* se encontraron diferencias en síntomas asociadas a la temperatura (Scholthof, 2008). Se sabe que de manera natural el ambiente puede contribuir al incremento o disminución de la frecuencia de poblaciones de virus (García *et al.*, 2001). En el caso de IYSV no se precisan condiciones ambientales que determinen variación en síntomas. No obstante, se ha relacionado la divergencia genética entre aislamientos, la gama de hospedantes y la respuesta de éstos a una adaptación ambiental (Pozzer *et al.*, 1999).

En todos los aislamientos típicos y severos analizados en la presente investigación mediante RT-PCR usando los iniciadores IYSV-KO4 e IYSV-KO6, se obtuvo el fragmento esperado de 1,100 pb que incluye el gen N + UTR5' (Figura 2A). La comparación de las secuencias obtenidas en ambos aislamientos no mostró diferencias entre

inoculadas en *Nicotiana tabacum*, diferencias en síntomas asociados con temperatura fueron observadas (Scholthof, 2008). Es conocido que el ambiente puede contribuir naturalmente a aumentar o disminuir la frecuencia de virus (García *et al.*, 2001). En el caso de IYSV, no se precisan condiciones ambientales que determinen variación en síntomas. Sin embargo, la divergencia genética entre aislamientos, el rango de hospedantes y la respuesta de éstos a una adaptación ambiental (Pozzer *et al.*, 1999).

En todos los aislamientos típicos y severos analizados en esta investigación mediante RT-PCR usando los iniciadores IYSV-KO4 e IYSV-KO6, se obtuvo el fragmento esperado de 1,100 pb que incluye el gen N + UTR5' (Figura 2A). Una comparación de las secuencias obtenidas de ambos aislamientos no mostró diferencias entre ellas; estos resultados son similares a los reportados por Bag *et al.* (2012). Según García *et al.* (2001), las cepas virales son grupos de aislamientos con propiedades similares como el rango de hospedantes, capacidad de transmisión y secuencias de nucleótidos similares, entre otros. En México, TSWV es el único tospovirus que ha sido biológicamente y molecularmente caracterizado. González (2014) estudió tres aislamientos mexicanos de TSWV y encontró que la diferencia en severidad puede estar asociada con cambios en los aminoácidos en las proteínas Nsm y NSs, así como en las regiones intergénicas (IGR). Esto puede deberse al hecho de que la proteína NSs del tospovirus actúa como un supresor de silenciamiento (Ocampo *et al.*, 2016), y por lo tanto, sería necesario analizar otros genes en estudios de caracterización molecular. Las secuencias obtenidas con los iniciadores IYSV-KO4 e IYSV-KO6 de los aislamientos típicos y severos probados (Figura 2B) tuvieron una identidad del 98 al 99% con la nucleoproteína de la cápsida del gen N de IYSV. El análisis *in silico* de las secuencias obtenidas (datos no mostrados) usando los iniciadores IYSV-KO4 e IYSV-KO6 de ambos aislamientos mediante RFLP con

ellas, resultados similares reportados por Bag *et al.* (2012). De acuerdo con García *et al.*, (2001) las cepas virales se consideran como un conjunto de aislamientos que mantienen propiedades similares como son el rango de hospedantes, capacidad de transmisión y similitud de secuencias de nucleótidos, entre otras. En México el TSWV es el único tospovirus caracterizado biológica y molecularmente. González (2014) estudió tres aislamientos mexicanos de TSWV y encontró que la diferencia en la severidad podría estar asociada a cambios en los aminoácidos de las proteínas NSm, NSs y de las regiones intergénicas (IGR). Esto podría explicarse debido a que la proteína NSs de tospovirus actúa como un supresor del silenciamiento génico (Ocampo *et al.*, 2016) por lo que sería necesario analizar otros genes en estudios de caracterización molecular. Las secuencias obtenidas con los iniciadores IYSV-KO4 e IYSV-KO6 de los aislamientos típicos y severos analizados (Figura 2B) tuvieron de 98 a 99% de identidad con la nucleoproteína de la cápside del gen N de IYSV. El análisis *in silico* de las secuencias obtenidas (Datos no mostrados) con IYSV-KO4 e IYSV-KO6 de ambos aislamientos mediante RFLP con *HinfI*, mostró un patrón de restricción que incluye un fragmento mayor de 308 pb correspondiente con el genotipo IYSV_{BR} asociado con aislamientos de Asia (Iftikhar *et al.*, 2014). Por otro lado, se encontró que aislamientos de IYSV del estado de Zacatecas correspondieron al genotipo IYSV_{NL} relacionado con aislamientos de Norteamérica (Velásquez-Valle *et al.*, 2016). Asimismo, en Zacatecas y Michoacán se ha reportado la presencia de lesiones cloróticas en hojas con pequeñas islas verdes en el centro (Velásquez-Valle *et al.*, 2016; Ávila *et al.*, 2017), mientras que en Morelos no se tiene registro de este tipo de síntoma (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren la existencia de variantes de IYSV en México que difieren biológica y molecularmente. Con

HinfI showed a restriction pattern that includes a fragment larger than 308 bp which corresponds to the IYSV_{BR} genotype associated with isolates from Asia (Iftikhar *et al.*, 2014). On the other hand, it was found that IYSV isolates from the state of Zacatecas corresponded to the IYSV_{NL} genotype associated with isolates from North America (Velásquez-Valle *et al.*, 2016). The presence of chlorotic lesions on leaves with small green islands in the middle has also been reported in Zacatecas and Michoacán (Velásquez-Valle *et al.*, 2016; Ávila *et al.*, 2017), while in Morelos there is no record of this type of symptom (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016). These results suggest that there are IYSV variants in Mexico that are biological and molecularly different. Regarding the phylogenetic analysis, isolates from Morelos were found to be more similar to those reported in Canada, United States and New Zealand and not to those from Asia, where the IYSV_{BR} genotype is mainly concentrated. Iftikhar *et al.* (2014) mentioned in their study that there are exceptions where the IYSV_{BR} genotypes are grouped with IYSV_{NL}, and vice versa; however, those results may provide information on how the virus spreads across countries (Smith *et al.*, 2006). Also, typical and severe isolates are concentrated in a clade that is divided into three groups: group I consists mainly of severe isolates, while groups II and III consist of moderate isolates (data not shown). Abad *et al.* (2003) and Bag *et al.* (2012) studied isolates from different states of western United States. In the first study, greater genetic diversity was found among isolates that were grouped with other isolates from different countries, while in the second study, the isolates were grouped in the same clade. Based on these results, the fact that different groups of IYSV isolates have developed in Zacatecas and Morelos suggests that there is greater genetic diversity of the virus in Mexico (Smith *et al.*, 2006). Such diversity may affect the

respecto al análisis filogenético, los aislamientos de Morelos mostraron mayor similitud con los reportados en Canadá, Estados Unidos y Nueva Zelanda y no con los asiáticos donde se concentra principalmente el genotipo IYSV_{BR}. Iftikhar *et al.* (2014) mencionan en su estudio que existen excepciones donde los genotipos IYSV_{BR} se agrupan con los IYSV_{NL} y viceversa; sin embargo, tales resultados podrían proporcionar información sobre el movimiento del virus entre países (Smith *et al.*, 2006). A su vez, los aislamientos típicos y severos se concentran en un clado que se divide en tres grupos: grupo I formado principalmente con aislamientos severos, mientras que el II y III por aislamientos moderados (Datos no mostrados). Por su parte, Abad *et al.* (2003) y Bag *et al.* (2012) estudiaron aislamientos procedentes de distintos estados del oeste de Estados Unidos; en el primer caso se encontró mayor diversidad genética entre aislamientos agrupándose con otros procedentes de diversos países, mientras que en el segundo estudio los aislamientos se agruparon dentro en un mismo clado. Con base en lo anterior, la formación de distintos grupos de aislamientos de IYSV que se generan de Zacatecas y Morelos sugiere una mayor diversidad genética de este virus en el país (Smith *et al.*, 2006). Esta diversidad puede influir en la eficiencia de transmisión del virus por trips vectores, gama de malezas hospedantes, severidad e incidencia de plantas con síntomas y, en general, en el progreso espacio-temporal de la enfermedad en ambas entidades (Ávila *et al.*, 2017).

En conclusión se tiene que los aislamientos típicos y severos de *Iris yellow spot virus* analizados en el presente estudio tuvieron la capacidad de infectar *N. benthamiana* y desarrollar síntomas similares con diferente severidad en dos condiciones ambientales. En el análisis del gen N no se encontraron cambios de secuencia de nucleótidos entre ambos aislamientos.

efficiency of virus transmission by vector thrips, the range of host weed species, the severity and incidence of plants with symptoms and, in general, the spatio-temporal disease progress in both states (Ávila *et al.*, 2017).

In conclusion, the typical and severe *Iris yellow spot virus* isolates analyzed in the present research infected *N. benthamiana* and caused similar symptoms at different severity levels under two environmental conditions. The analysis of the N gene did not show changes in the sequence of nucleotides between both isolates.

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

## LITERATURA CITADA

- Abad JA, Speck J, Mohan SK and Moyer JW. 2003. Diversity of the *Iris yellow spot virus* N gene in the USA. *Phytopathology* 93: S1. Disponible en línea: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2003.93.6.S1>
- Ávila-Alistac N, Ramírez-Rojas S, Lozoya-Saldaña H, Reboilar-Alviter A, Guzmán-Plazola RA. 2017. Alternate hosts of *Iris yellow spot virus* and trips on onion crops in Morelos and Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fito patología* 35: 242-262. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1701-1>
- Bag S, Druffel KL and Pappu HR. 2010. Structure and genome organization of the large RNA of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). *Archives of Virology* 155:275-279. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0568-5>
- Bag S, Druffel KL, Salewsky T and Pappu HR. 2009. Nucleotide sequence and genome organization of the medium RNA of *Iris yellow spot virus* from the United States. *Archives of Virology* 154:715-718. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0349-1>
- Bag S, Schwartz HF and Pappu HR. 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. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0026-1>
- Bag S and Pappu HR. 2009. Symptomatology of *Iris yellow spot virus* in selected indicator hosts. Online. *Plant Health Progress*. <https://doi.org/10.1094/PHP-2009-0824-01-BR>
- García-Arenal F, Fraile A and Malpica JM. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual*

- Review of Phytopathology 39: 157-86. Disponible en línea: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.phyto.39.1.157>
- Gent DH, du Toit LJ, Fichtner SF, Mohan SK, Pappu HR and Schwartz HF. 2006. *Iris yellow spot virus*: An emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Disease* 90: 1468-1480. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1468>
- Gent DH, Schwartz HF and Khosla R. 2004. Distribution and incidence of *Iris yellow spot virus* in Colorado and its relation to onion plant population and yield. *Plant Disease* 88: 446-452. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.446>
- González PBE. 2014. Caracterización biológica y molecular del *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) en aislamientos mexicanos. Tesis Doctoral. Instituto de Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Disponible en línea: <http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/2271>
- Iftikhar R, Bag S, Ashfaq M and Pappu HR. 2014. First report of *Iris yellow spot virus* infecting onion in Pakistan. *Plant Disease* 97: 1517. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0502-PDN>
- Kritzman A, Lampel M, Raccah B and Gera A. 2001. Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease* 85: 838-842. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.8.838>
- Mandal B, Pappu HR, Csinos AS and Culbreath AK. 2006. Response of peanut, pepper, tobacco, and tomato cultivars to two biologically distinct isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease* 90: 1150-1155. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-1150>
- Ocampo OT, Gabriel PSM, Bacheller N, Uiterwaal S, Knapp A, Hennen A, Ochoa-Martínez DL and García-Ruiz H. 2016. Antiviral RNA silencing suppression activity of *Tomato spotted wilt virus* NSs protein. *Genetics and Molecular Research* 15(2): gmr.15028625. DOI: 10.4238/gmr.15028625
- Pappu HR, duToit LJ, Schwartz HF and Mohan SK. 2006. Sequence diversity of the nucleoprotein gene of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*) isolates from the western region of the United States. *Archives of Virology* 151: 1015-1023. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-005-0681-z>
- Pozzer L, Bezerra IC, Kormelink R, Prins M, Peters D, Resende RO and de Ávila AC. 1999. Characterization of a tospovirus isolate of *Iris yellow spot virus* associated with a disease in onion fields in Brazil. *Plant Disease* 83: 345-350. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.4.345>
- Ramírez-Rojas S, Ornelas-Ocampo K, Osuna-Canizalez FJ, Bartolo-Reyes JC, Varela-Loza V, Hernández-Romano J y Ochoa-Martínez DL. 2016. Detection of *Iris yellow spot virus* in onion plants from Tepalcingo, Morelos state, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 309-315. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1604-1>
- Robène-Soustrade I, Hostachy B, Roux-Cuvelier M, Minatchy J, Hédont M, Pallas R, Couteau A, Cassam N and Wuster G. 2006. First report of *Iris yellow spot virus* in onion bulb- and seed-production fields in Réunion Island. *Plant Pathology* 55: 288. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01262.x>
- Scholthof KBG. 2008. *Tobacco Mosaic Virus*: The Beginning of Plant Pathology. Online. APSnet Features. DOI:10.1094/APSnetFeatures-2008-0408
- Smith TN, Jones RAC and Wylie SJ. 2006. Genetic diversity of the nucleocapsid gene of *Iris yellow spot virus*. *Australian Plant Pathology* 35: 359. <http://dx.doi.org/10.1071/AP06031>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR, Salas-Muñoz S, Mauricio-Castillo JA and Pappu HR. 2016. First confirmed report of *Iris yellow spot virus* in onion nurseries in Zacatecas, Mexico. *Plant Disease* 100: 1509. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0061-PDN>
- Zamboni A, Pierantoni L and De Franceschi P. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody plants. *iForest-Biogeosciences and Forestry* 1: 122-125. <http://dx.doi.org/10.3832/ifer0465-0010122>