

Alternate hosts of *Iris yellow spot virus* and trips on onion crops in Morelos and Michoacan, Mexico

Hospedantes alternos de *Iris yellow spot virus* y trips en cultivos de cebolla de Morelos y Michoacán, México

Norma Ávila-Alistac*, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, C. P. 56230; **Sergio Ramírez-Rojas**, Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. km 0.5 Carretera Zacatepec-Galeana. Col. Centro Zacatepec, Morelos, C. P. 62780; **Héctor Lozoya-Saldaña**, Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carr. México-Texcoco. Chapingo, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230; **Ángel Rebollar-Alviter**, Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional Morelia (CRUCO), Perif. Paseo de la República 1000, Lomas del Valle, Morelia, Michoacán, C. P. 58170; **Remigio Anastacio Guzmán-Plazola**, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, C. P. 56230. *Autor para correspondencia: alixtac@gmail.com.

Recibido: 17 de Enero, 2017.

Aceptado: 19 de Marzo, 2017.

Ávila-Alistac N, Ramírez-Rojas S, Lozoya-Saldaña H, Rebollar-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 Fitopatología* 35: 242-262.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1701-1

Primera publicación DOI: 12 de Abril, 2017.

First DOI publication: April 12, 2017.

Resumen. El objetivo de la investigación fue identificar hospedantes alternos de *Iris yellow spot virus* (IYSV) y establecer el rango de hospedantes del putativo vector(es) en regiones productoras de cebolla (*Allium cepa*) de Morelos y Michoacán, México. En 10 localidades de ambos estados se muestrearon cultivos de cebolla y arvenses, en presencia y ausencia del cultivo. Las plantas de cebolla se analizaron por RT-PCR y las arvenses

Abstract. The main goal of this research was to identify alternate hosts of *Iris yellow spot virus* (IYSV) and to establish the range of hosts of the putative vector(s) in onion (*Allium cepa*) producing regions of Morelos and Michoacan, Mexico. In 10 localities of both states, onion crops and weeds were sampled in the presence and absence of the crop. Onion plants were analyzed by RT-PCR and the weeds by DAS-ELISA. The weeds were identified at species level, the thrips collected from weeds were established colony for identification by PCR, with specific primers that amplify a segment of the cytochrome oxidase I (COI) gene. A total of 295 weeds grouped in 56 species (23 families) were analyzed and identified. All the weeds were negative for IYSV. Thrips were detected on 75 weeds grouped in 17 species. Thirty-three thrips populations were analyzed (22 from Morelos and 11 from Michoacan). Sequencing indicated identity with *Thrips tabaci* with a homology greater than

por DAS-ELISA. Las arvenses se identificaron a nivel especie, los trips colectados de las mismas se establecieron colonias para su identificación por PCR, con iniciadores específicos que amplifican un segmento del gen de citocromo oxidasa I (COI). Se analizaron e identificaron 295 arvenses agrupadas en 56 especies (23 familias), todas resultaron negativas para IYSV. Se detectaron trips en 75 arvenses agrupadas en 17 especies. Se analizaron 33 poblaciones de trips (22 de Morelos y 11 de Michoacán). La secuenciación indicó identidad con *Thrips tabaci* con una homología superior a 97 %. Las arvenses *Ricinus communis* y *Acalypha ostryifolia* registraron el mayor número de *T. tabaci*. En cebolla se confirmó la presencia de IYSV con RT-PCR en las 10 parcelas muestreadas. Este es el primer reporte de la presencia de IYSV en el estado de Michoacán.

Palabras clave: IYSV, *Tospovirus*, *Thrips tabaci*, PCR COI, *Ricinus communis*, *Acalypha ostryifolia*.

La cebolla es un cultivo de importancia económica en el país y es afectada por varias enfermedades, entre ellas las causadas por virus que ocasionan pérdidas considerables y son de difícil manejo. *Iris yellow spot virus* (IYSV) del género *Tospovirus*, agente causal de la enfermedad conocida como mancha blanca en cebolla, es uno de los virus de importancia en plantas del género *Allium* (Brewster, 2008), por su amplia distribución geográfica y un gran rango de hospedantes (Ghotbi *et al.*, 2005; Sampangi y Mohan, 2007; Smith *et al.*, 2011). En México se ha reportado su presencia en los estados de Zacatecas (Velásquez-Valle y Reveles-Hernández, 2011) y Morelos en el cultivo de cebolla (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016) y en Guanajuato en el cultivo de ajo (Pérez-Moreno *et al.*, 2010). La especie *Thrips tabaci* es el principal vector de

97 %. Weeds *Ricinus communis* and *Acalypha ostryifolia* were found with high number of *T. tabaci*. In onion, the presence of IYSV was confirmed with RT-PCR in the ten field plots sampled. This is the first report of IYSV in Michoacan state.

Key words. IYSV, *Tospovirus*, *Thrips tabaci*, COI PCR, *Ricinus communis*, *Acalypha ostryifolia*.

Onion is a highly economically important crop in Mexico, and it can be affected by several diseases, including those caused by a virus that cause considerable losses and are difficult to handle. The *Iris yellow spot virus* (IYSV) of the *Tospovirus* genus, causal agent of the disease known as white spot in onion, is one of the most important viruses in plants of the genus *Allium* (Brewster, 2008), due to its wide geographical distribution and range of hosts (Ghotbi *et al.*, 2005; Sampangi and Mohan, 2007; Smith *et al.*, 2011). In Mexico its presence has been reported in the states of Zacatecas (Velásquez-Valle and Reveles-Hernández, 2011) and Morelos in onion plantations (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016), and in Guanajuato, in garlic plantations (Pérez-Moreno *et al.*, 2010). The species *Thrips tabaci* is the main vector of IYSV. On the other hand, alternate hosts of the virus and its vector play a crucial role in the epidemiology of the disease caused by IYSV, particularly if these insects complete their biological cycle in these plants (Hsu *et al.*, 2011). This highlights the importance of performing studies related to the vector, alternate hosts, the virus, and interactions amongst them, in order to provide knowledge to help design better disease management strategies, since this type of interactions could influence the appearance of new types of viruses (Rodríguez *et al.*, 2007). Likewise, the ability of trip vectors to grow on non-cultivated plants and permanently subsist in the field may be

IYSV. Por otra parte, los hospedantes alternos del virus y su vector toman un papel fundamental en la epidemiología de la enfermedad causada por el IYSV, sobre todo si estos insectos completan su ciclo biológico en dichas plantas (Hsu *et al.*, 2011). Esto resalta la importancia de realizar estudios relacionados con el vector, hospedantes alternos, el virus y las interacciones entre ellos, a fin de generar mayor conocimiento que permitan diseñar mejores estrategias de manejo de la enfermedad, ya que este tipo de interacciones puede influir en la aparición de nuevas variantes del virus (Rodríguez *et al.*, 2007). Así mismo, la capacidad que tienen los trips vectores para desarrollarse en plantas no cultivadas y subsistir de forma permanente en campo puede ser de significancia epidemiológica, sobre todo en la dispersión secundaria del virus (Chatzivassiliou *et al.*, 2007; Syller, 2012). En Morelos, el IYSV es importante debido a la alta incidencia (100 %) y severidad (superior al 90 %) con que se presenta en las zonas productoras de la entidad (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016). Por otro lado, en Michoacán, el IYSV ha pasado prácticamente inadvertido por los productores de cebolla a pesar de estar presente en el cultivo. Este contraste en intensidad de la enfermedad en ambos estados puede deberse a diferentes factores relacionados con el ambiente, al hospedante principal y alternos (arvenses), el virus, vectores, entre otros. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue identificar hospedantes alternos de *Iris yellow spot virus* (IYSV) y establecer el rango de hospedantes del putativo vector(es), en regiones productoras de cebolla de Morelos y Michoacán, México, y generar información que contribuya a explicar estas diferencias de intensidad epidémica en ambas entidades.

epidemiologically significant, particularly in the secondary spreading of the virus (Chatzivassiliou *et al.*, 2007; Syller, 2012). In Morelos, IYSV is important due to its high incidence (100 %) and severity (above 90 %) with which it appears in the production areas of the entity (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016). On the other hand, in Michoacan, IYSV has practically gone unnoticed by onion farmers despite its presence in the crop. This contrast in the intensity of the disease in both states could be due to different environment-related factors, the main and alternate hosts (weeds), the virus, vectors, and others. Based on this, the aim of this investigation was to identify alternate *Iris yellow spot virus* (IYSV) hosts and establish the range of hosts of the putative vector(s) in onion-producing regions of Morelos and Michoacan, Mexico, and generate information that contributes to explain these differences in epidemic intensity in both entities.

MATERIALS AND METHODS

Collecting and identifying weeds

Weeds were collected from 10 fields used for the planting of onion in the municipalities of Puente de Ixtla (one field), Ayala (two fields), Axochiapan (one field) and Emiliano Zapata (one field) in Morelos, as well as in Vista Hermosa (two fields) and Tanhuato (three fields) in Michoacán. The samples were taken in December 2014 (Morelos), January (Morelos and Michoacan), July (Morelos), October 2015 (Morelos and Michoacán) and January 2016 (Morelos and Michoacan) in the presence and absence of the crop. The collection of samples was

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta e identificación de arvenses

Se colectaron arvenses en 10 parcelas destinadas al cultivo de cebolla en los municipios de Puente de Ixtla (una parcela), Ayala (dos parcelas), Axochiapan (una parcela) y Emiliano Zapata (una parcela) en Morelos, así como en Vista Hermosa (dos parcelas) y Tanhuato (tres parcelas) en Michoacán. 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. El muestreo fue dirigido en base a cuatro criterios: a arvenses previamente reportados como hospedantes de IYSV (Sampangi *et al.*, 2007; Weilner y Bedlan 2013; Schwartz *et al.*, 2014), plantas con síntomas putativos a virosis (mosaicos, clorosis, deformaciones foliares y manchas blancas), plantas cercanas a plantas de cebolla que presentaban síntomas de virus, y las arvenses más abundantes en el momento del muestreo. Se seleccionaron de preferencia plantas en etapa fenológica avanzada. Estas se colocaron en bolsas de plástico con papel húmedo y se transportaron al laboratorio donde fueron identificadas con claves taxonómicas (Espinosa y Sarukhán, 1997; Rzedowski *et al.*, 2001; Rzedowski *et al.*, 2004; Vibrans y Tenorio, 2012) hasta nivel de especie.

Detección de IYSV en cebolla

Con la finalidad de confirmar la presencia del virus se tomaron muestras de plantas de cebolla en las mismas parcelas donde se realizó la colecta de arvenses. El muestreo fue dirigido a plantas (cinco plantas) que presentaron síntomas típicos del IYSV, considerando la presencia de lesiones cloróticas o

based on four criteria: weeds previously reported as IYSV hosts (Sampangi *et al.*, 2007; Weilner and Bedlan 2013; Schwartz *et al.*, 2014), plants with putative symptoms to virosis (mosaics, chlorosis, foliar deformities, and white stains), plants near onion plants with viral symptoms, and the most abundant weeds at the time of collecting samples. Plants in advanced phenological stages were preferred. These were placed in plastic bags with moist paper and transported to the laboratory, where they were identified with taxonomical codes (Espinosa and Sarukhán, 1997; Rzedowski *et al.*, 2001; Rzedowski *et al.*, 2004; Vibrans and Tenorio, 2012) up to the level of species.

Detecting IYSV in onion

To confirm the presence of the virus, onion plant samples were taken from the same fields from which weeds were taken. The collection of samples was aimed at plants (five plants) with typical IYSV symptoms, considering the presence of chlorotic or long white wounds with or without a green islet in the center (Gent *et al.*, 2006; Weilner and Bedlan, 2013). RNA was extracted from symptomatic plants using the method by TRIzol[®] Reagent, following manufacturer instructions (life technologies[™]). Later, the pathogen was identified using the reverse-transcription technique of the polymerase chain reaction (RT-PCR), with specific primers that amplify a strip of 750 pb of the gene, which codifies for the protein of the nucleocapsid of the virus: IYSV-For (TGG YGG AGA TGY RGA TGT GGT) and IYSV-Rev (ATT YTT GGG TTT AGA AGA CTC ACC) (du Toit *et al.*, 2007). The reaction mixture for PCR has a final volume of 25 µL: 2.5 µL of buffer PCR 5X, 1.25 µL of MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL dNTP's (10 mM), 0.5 µL for each primer (10 mM), 0.5 µL de Taq polymerase (5U/µL) and 2 µL of cDNA. The conditions for the

blancas alargadas y con presencia o ausencia de una isla verde en el centro (Gent *et al.*, 2006; Weilner y Bedlan, 2013). De plantas sintomáticas se realizó la extracción de ARN total con el método de TRIzol® Reagent de acuerdo con las instrucciones del fabricante (life technologies™). Posteriormente, la identificación del patógeno se realizó mediante 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). La mezcla de reacción para la PCR fue de un volumen final 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 cada iniciador (10 mM), 0.5 µL de Taq polimerasa (5U/µL) y 2 µL de cDNA. Las condiciones para la PCR consistió en una desnaturalización inicial a 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. Los productos de PCR se visualizaron en un fotodocumentador mediante electroforesis en un gel de agarosa al 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 GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). Solo un aislamiento de IYSV obtenido de Michoacán se inoculó en plantas indicadoras de *Nicotiana benthamiana* (Kritzman *et al.*, 2001), esto con la finalidad de tener un respaldo del aislamiento para su posterior uso. Para verificar

PCR were an initial denaturalization at 94 °C for 2 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 30 s, 51 °C for 30 s and 68 °C for 1 min and a final extension of 68 °C for 7 min. The products of PCR were viewed in a photodocumentor by electrophoresis in a 1 % agarose gel, previously dyed with ethidium bromide. From the products amplified, four samples (two from Michoacán and two from Morelos) were purified using Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System and sent for sequencing to the company Macrogen Inc. in South Korea, and the sequences were compared in the GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) data bank. Only one IYSV isolate, obtained in Michoacán, was inoculated in plants indicating *Nicotiana benthamiana* (Kritzman *et al.*, 2001), in order to have a backup of the isolate for later use. To verify the presence of the virus in inoculated plants, RNA was extracted from inoculated tissue and RT-PCR.

Detecting IYSV in weeds

Due to the number of weeds collected, the serological test DAS-ELISA was used, with the specific antibody for IYSV following indications by the manufacturer (Agdia®). Samples of each weed collected, consisting of leaves of the lower, middle, and lower sections, were analyzed in duplicate. For weeds with symptoms, a sample composed of diseased and healthy tissues, was taken. The positive control was used for the virus, and the negative control (healthy onion tissue) was acquired from Agdia®. The samples were measured in an ELISA plate reader at a wavelength of 405 nm (A₄₀₅). The reaction was considered positive if the absorbance value was three times greater to the average of the negative control (Sutula *et al.*, 1986).

la presencia del virus en las plantas inoculadas se realizó extracción de ARN del tejido inoculado y RT-PCR.

Detección de IYSV en arvenses

Por el número de arvenses colectadas, se utilizó la prueba serológica DAS-ELISA con el anticuerpo específico para el IYSV siguiendo las indicaciones del fabricante (Agdia®). Se analizaron por duplicado muestras compuestas de cada arvense colectada, consistentes en hojas de la parte baja, media y alta. En el caso de arvenses con síntomas se realizó una muestra compuesta de tejido enfermo y tejido sano. Se utilizó el control positivo para el virus y control negativo (tejido de cebolla sano) adquiridos de Agdia®. Las muestras se midieron en un lector de placas ELISA a una longitud de onda 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).

Presencia de trips

El haz y envés de las hojas de plantas arvenses colectadas se revisaron para verificar la presencia de trips. En las plantas donde se detectó la presencia de los insectos, con un pincel de punta fina se colectaron adultos o inmaduros (según fuera el caso) para establecer colonias, estos fueron depositados de forma individual en frascos de plástico con aberturas cubiertas con tela organza para permitir la entrada de aire y dentro de ellos se colocaron ejotes frescos (*Phaseolus vulgaris*) para su alimentación. Los ejotes deshidratados se sustituyeron por frescos dos veces por semana. Los frascos con los trips se mantuvieron en condiciones de laboratorio con un fotoperiodo de 12 h, temperatura promedio de 24 ± 1 °C y 42 % de humedad relativa hasta que se observó el incremento de individuos para su identificación por PCR.

Presence of thrips

Both sides of the weed leaves collected were checked for thrips. In plants in which these insects were found, using a fine-tip brush, adult or immature insects (depending on each case) were collected to form colonies, and were deposited individually in plastic jars with holes covered in cloth to let air in, and inside them, green beans (*Phaseolus vulgaris*) for them to feed on. The dehydrated green beans were replaced with fresh ones twice a week. The jars with thrips were kept under laboratory conditions with a photoperiod of 12 h, an average temperature of 24 ± 1 °C and a relative humidity of 42 % until an increase of individuals was observed for their identification using PCR.

DNA extraction and PCR in thrips

From the colonies established, total DNA was taken using CTAB from 15 adults, and its quality and concentration was determined using a spectrophotometer. The PCR was carried out with primer that amplify a fragment of 710 pb of the gene cytochrome oxidase I (COI): LCO1490 (5'GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G3') and HCO2198 (5'TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA3') (Folmer *et al.*, 1994). The PCR was carried out in a volume of 25 µL consisting of: 1.25 µL of $MgCl_2$ (25 mM), 0.5 µL of dNTP's (10 mM), 0.5 µL of each primer (10 mM), 0.5 µL of Taq polymerase, 2.5 µL 10X PCR buffer, 4 µL of DNA (10-50 ng/µL) and water. The PCR was carried out under the following conditions: 94 °C for 4 min for the initial denaturalization, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 5 min. The amplified products were viewed in electrophoresis in agarose gel at 1 % containing ethidium bromide. The products of the PCR were

Extracción de ADN y PCR en trips

De las colonias establecidas, se extrajo ADN total con CTAB a partir de 15 adultos y se determinó su calidad y concentración en el espectrofotómetro. La PCR se realizó con iniciadores que amplifican un fragmento de 710 pb del gen 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 un volumen de 25 µL consistente en: 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 bajo 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. Los productos de PCR se purificaron con Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y se secuenciaron en ambas direcciones. Las secuencias se analizaron con el programa Chromas LITE versión 2.1.1, posteriormente se crearon secuencias consenso de cada muestra con el programa Vector NTI 8 y se compararon con las depositadas del banco de datos de secuencias genéticas (GenBank).

RESULTADOS

Colecta e identificación de arvenses

Se colectaron 212 arvenses en el estado de Morelos (33 arvenses en 2014, 150 arvenses en 2015 y 29 arvenses en 2016) y 83 en Michoacán (67 arvenses en 2015 y 16 arvenses en 2016), que en

purified using Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System and were sequenced in both directions. The sequences were analyzed using the program Chromas LITE version 2.1.1, and afterwards, consensus sequences were created from each sample using the program Vector NTI 8 and they were compared with those deposited in the genetic sequences data bank (GenBank).

RESULTS

Collection and identification of weeds

A total of 212 weeds were collected in the state of Morelos (33 weeds in 2014, 150 in 2015 and 29 in 2016) and 83 in Michoacan (67 weeds in 2015 and 16 weeds in 2016), for a total of 56 species belonging to 23 families (Table 1). Out of these, 41 species were identified as belonging to 18 families for Morelos and 26 species from 14 families in Michoacan. *Ricinus communis*, *Acalypha ostryifolia*, *Parthenium hysterophorus* and *Tithonia tubiformis* were the most abundant in the state of Morelos, whereas *Amaranthus hybridus*, *Parthenium hysterophorus*, *Sonchus oleraceus* and *Chenopodium murale* were the most frequent in Michoacan.

Detecting IYSV in onion

Using the RT-PCR technique, we identified IYSV in the 10 onion fields; the plants presented well-developed bulbs. The virus was not found in young plants (before the bulb was formed). The presence of the pathogen was confirmed in both the state of Morelos and Michoacan. The symptoms were pale white, elongated wounds, and some plants presented green islets in the middle of them; these symptoms were most frequent in the

conjunto comprendieron un total de 56 especies pertenecientes a 23 familias (Cuadro 1). De estos se identificaron 41 especies pertenecientes a 18 familias para Morelos y 26 especies dentro de 14 familias en Michoacán. *Ricinus communis*, *Acalypha ostryifolia*, *Parthenium hysterophorus* y *Tithonia tubiformis* fueron más abundantes en el estado de Morelos, mientras que *Amaranthus hybridus*, *Parthenium hysterophorus*, *Sonchus oleraceus* y *Che-nopodium murale* lo fueron en Michoacán.

Detección de IYSV en cebolla

Mediante la técnica de RT-PCR se identificó al IYSV en las 10 parcelas con cultivo de cebolla establecido, las plantas presentaron un bulbo desarrollado. En plantaciones jóvenes (antes de la formación del bulbo) no se detectó al virus. Se confirmó la presencia del patógeno tanto en el estado de Morelos como en Michoacán. Los síntomas fueron lesiones de color blanco pajizo, alargadas y en algunas plantas se detectaron islas verdes en el centro de las mismas, estos síntomas se presentaron con mayor frecuencia en el estado de Michoacán (Figura 1). Las cuatro muestras secuenciadas (dos de Morelos y dos de Michoacán) mostraron un 99 % de identidad con el gen de la nucleocápside para IYSV. Las plantas inoculadas en *N. benthamiana* con el aislamiento de Michoacán, presentaron síntomas de manchas cloróticas en las hojas inoculadas y no inoculadas, así como necrosis. La presencia de IYSV fue confirmada en el tejido de *N. benthamiana* por RT-PCR al ser inoculadas por el virus (Figura 2).

Detección de IYSV en arvenses

Se analizaron 295 plantas procedentes de ambas entidades en diferentes tiempos de colecta (212 de Morelos y 83 de Michoacán) y ninguna de ellas

state of Michoacan (Figure 1). The four samples sequenced (two from Morelos and two from Michoacan) displayed an identity of 99 % with the gene of the nucleocapsid for IYSV. The plants inoculated in *N. benthamiana* with the isolate from Michoacan presented symptoms of chlorotic stains in inoculated and non-inoculated leaves, as well as necrosis. The presence of IYSV was confirmed in *N. benthamiana* tissue by RT-PCR, since it was inoculated by the virus (Figure 2).

Detecting IYSV in weeds

An analysis was carried out on 295 plants from both states in different collection times (212 from Morelos and 83 from Michoacan) and none of them were positive for *Iris yellow spot virus* for DAS-ELISA, except for the positive control. Only 102 weeds (34 %) showed putative symptoms for virosis such as mosaics, yellowing, foliar deformity, and chlorotic spots; however, no symptoms were caused by IYSV. The greatest number of weeds with symptoms was collected in Morelos. The remaining plants were asymptomatic (Figure 3).

Presence of thrips

Out of the 295 different weeds observed, 75 (25.4 %) presented thrips, out of which 61 came from the state of Morelos and 14 from Michoacan. These insects were observed in 17 species of weeds belonging to the families *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Amaranthaceae*, *Cruciferae*, *Convolvulaceae*, *Malvaceae*, and *Acanthaceae*. The thrips were mostly found in *R. communis* (30 of 31 plants analyzed); 27 plants were from the state of Morelos and three from Michoacan, followed by *Acalypha ostryifolia*, *Amaranthus hybridus* and *Parthenium hysterophorus*, although in less frequency. On the other hand, out of these

Cuadro 1. Especies de arvenses colectadas y analizadas para IYSV por DAS-ELISA, y presencia de trips en arvenses en las regiones productoras de cebolla de los estados de Morelos y Michoacán, México.
Table 1. Table 1. Species of weeds gathered and analyzed for IYSV by DAS-ELISA, and presence of thrips in weeds in the onion-producing regions of the states of Morelos and Michoacan, Mexico.

Familia/especie	Municipios de Morelos*Michoacán	Época de colecta de arvenses orelas*Michoacán	Municipios donde se encontraron plantas con trips	Plantas con trips/ Plantas revisadas	Plantas analizadas ELISA/Plantas negativas para IYSV
Acanthaceae					
<i>Dicliptera peduncularis</i>	Ay/ Ez	IVO	Ay	2/4	4/4 (-)
Amaranthaceae					
<i>Amaranthus hybridus</i>	Ay/Ax/Ez *Vh/Ta	IVO *IO	Ay *Vh	7/27	27/27 (-)
<i>Amaranthus spinosus</i>	Ax/Ay	O	Np	0/4	4/4 (-)
Asteraceae					
<i>Parthenium hysterophorus</i>	Ay/Ax/Pi/Za/Ez/Xo* Vh/Ta	IVO*OI	Ay/Ax/Ez*Vh/Ta	6/34	34/34 (-)
<i>Bidens pilosa</i>	Ay/Za	IVO	Np	0/5	5/5 (-)
<i>Tithonia tubiformis</i>	Ax/Pi/Ay/Xo*Vh	IVO*O	Pi/Ez/Ax	4/17	17/17 (-)
<i>Tithonia diversifolia</i>	Vh	OI	Np	0/5	5/5 (-)
<i>Lactuca serriola</i>	Vh	I	Vh	1/1	1/1 (-)
<i>Verbesina crocata</i>	Ax/Pi/Ay	IO	Np	0/4	4/4 (-)
<i>Conyza spp.</i>	Ay * Ta	I * I	Np	0/3	3/3 (-)
<i>Flaveria trinervia</i>	Xo/Ay * Vh	IV * O	Np	0/5	5/5 (-)
<i>Sanvitalia procumbens</i>	Ay/Pi/Xo	IVO	Np	0/4	4/4 (-)
<i>Sonchus oleraceus</i>	Ay * Vh/Tan	I * IO	Vh	1/10	10/10 (-)
Chenopodiaceae					
<i>Chenopodium murale</i>	Ta/Vh	IO	Np	0/6	6/6 (-)
<i>Chenopodium album</i>	Ta	O	Np	0/1	1/1 (-)
Convolvulaceae					
<i>Ipomoea purpurea</i>	Ay/Ez/Xo/Pi * Ta	IVO * I	Ez/Ay	2/7	7/7 (-)
Cruciferae					
<i>Lepidium virginicum</i>	Ay/Ax*Vh/Ta	I *I	Ta	1/5	5/5/ (-)
Euphorbiaceae					
<i>Acalypha ostryifolia</i>	Ay/Xo/Pi/Ez/Ax*Ta	IVO*O	Ez/Ay/Ax	10/27	27/27 (-)
<i>Ricinus comunis</i>	Ax/Pi/Ez/Ay*Vh	IVO*OI	Ax/Pi/Ez/Ay*Vh	30/31	31/31 (-)
<i>Acalypha arvensis</i>	Pi/Ez/Xo	IVO	Pi	1/11	11/11 (-)
<i>Euphorbia heterophylla</i>	Ay/Ax	IO	Np	0/3	3/3 (-)
Lamiaceae					
<i>Salvia tiliifolia</i>	Vh/Ta	O	Np	0/2	2/2 (-)
Malvaceae					
<i>Malva parviflora</i>	Ta/Vh	IO	Ta/Vh	2/6	6/6 (-)
<i>Anoda cristata</i>	Pi/Ay/Ax	IVO	Pi/Ax	3/5	5/5 (-)
<i>Malvastrum coromandelianum</i>	Pi/Ay/Ax	OVI	Pi/Ax	2/9	9/9 (-)
Portulacaceae					
<i>Portulaca oleracea</i>	Ay/Ax/Pi/Ez*Vh/Ta	IVO*O	Np	1/12	12/12 (-)
Solanaceae					
<i>Solanum rostratum</i>	Ay/Ax/Pi	IV	Np	0/3	3/3 (-)
<i>Capsicum sp.</i>	Pi	V	Np	0/2	2/2 (-)
<i>Physalis ixocarpa</i>	Vh	O	Np	0/2	2/2 (-)
Zygophyllaceae					
<i>Kallstroemia rosei</i>	Ay/Xo/Pi/Ax	IVO	Np	0/7	7/7 (-)

Ay: Ayala, Mor.; Pi: Puente de Ixtla, Mor.; Ez: Emiliano Zapata, Mor.; Ax: Axochiapan, Mor.; Xo: Xochitepec, Mor.; Vh: Vista Hermosa, Mich.; Ta: Tanhuato, Mich.; I: invierno (diciembre 2014 y/o enero 2015 y/o enero 2016); V: verano (julio 2015); O: Otoño (octubre 2015); Np: No presente / Ay: Ayala, Mor.; Pi: Puente de Ixtla, Mor.; Ez: Emiliano Zapata, Mor.; Ax: Axochiapan, Mor.; Xo: Xochitepec, Mor.; Vh: Vista Hermosa, Mich.; Ta: Tanhuato, Mich.; I: winter (December 2014 and/or January 2015 and/or January 2016); V: summer (July 2015); O: Autumn (October 2015); Np: Not present.



Figura 1. Síntomas ocasionados por el *Iris yellow spot virus* en hojas de cebolla: a) lesiones iniciales y avanzadas colectadas en el estado de Morelos y b) lesiones iniciales y avanzadas con presencia de una isla verde en el centro de la lesión colectadas en el estado de Michoacán.

Figure 1. Symptoms caused by the *Iris yellow spot virus* in onion leaves: a) initial and advanced wounds collected in the state of Morelos, and b) initial and advanced wounds with the presence of a green islet in the middle, collected in the state of Michoacan.



Figura 2. Síntomas de *Iris yellow spot virus* de Michoacán en *N. benthamiana*: a) Lesiones locales de IYSV en hoja inoculada de forma mecánica; b) Lesiones iniciales en hojas no inoculadas; c y d) Lesiones avanzadas en hojas no inoculadas con presencia de manchas cloróticas y necrosis en la hoja.

Figure 2. Symptoms of the *Iris yellow spot virus* from Michoacan in *N. benthamiana*: a) Local IYSV in mechanically inoculated leaf; b) Initial wounds in non-inoculated leaves; c and d) Advances wounds in non-inoculated leaves with chlorotic stains and necrosis in leaves.

fue positiva para *Iris yellow spot virus* por DAS-ELISA, excepto el control positivo. Solo 102 arvenses (34%) mostraron síntomas putativos de virosis como mosaicos, amarillamiento, deformación foliar y manchas cloróticas; no obstante, ningún síntoma fue causado por IYSV. El mayor número de arvenses con síntomas se colectó en Morelos. El resto de las plantas fueron asintomáticas (Figura 3).

Presencia de trips

De las 295 plantas observadas de diferentes arvenses, en 75 (25.4 %) se encontraron trips, de las cuales 61 pertenecieron al estado de Morelos y 14 de Michoacán. Estos insectos se observaron en 17 especies de arvenses pertenecientes a las familias *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Amaranthaceae*, *Cruciferae*, *Convolvulaceae*, *Malvaceae* y *Acanthaceae*. Los trips se encontraron en su mayoría en *R. communis* (30 de 31 plantas analizadas), 27

75 weeds, in the state of Morelos, 19 weeds were gathered when the onion plantation was established, and 42 in the absence of the crop. In the case of Michoacan, 11 weeds with thrips were collected in the absence of the crop and only three in its presence (Figure 4). It is worth highlighting that an increase was observed in the thrips populations in fields with onion crops, mainly in advanced phenological stages (formation of the bulb).

DNA extraction and PCR

Seventy-five colonies of thrips from the same number of plants collected in Morelos and Michoacan, were established. Out of the total number of colonies, only 33 increased their populations (25 from Morelos and eight from Michoacan). In all cases, the expected amplicon of 710 pb was obtained, and showed an identity of 97 to 100 % for *Thrips tabaci* (Table 2).

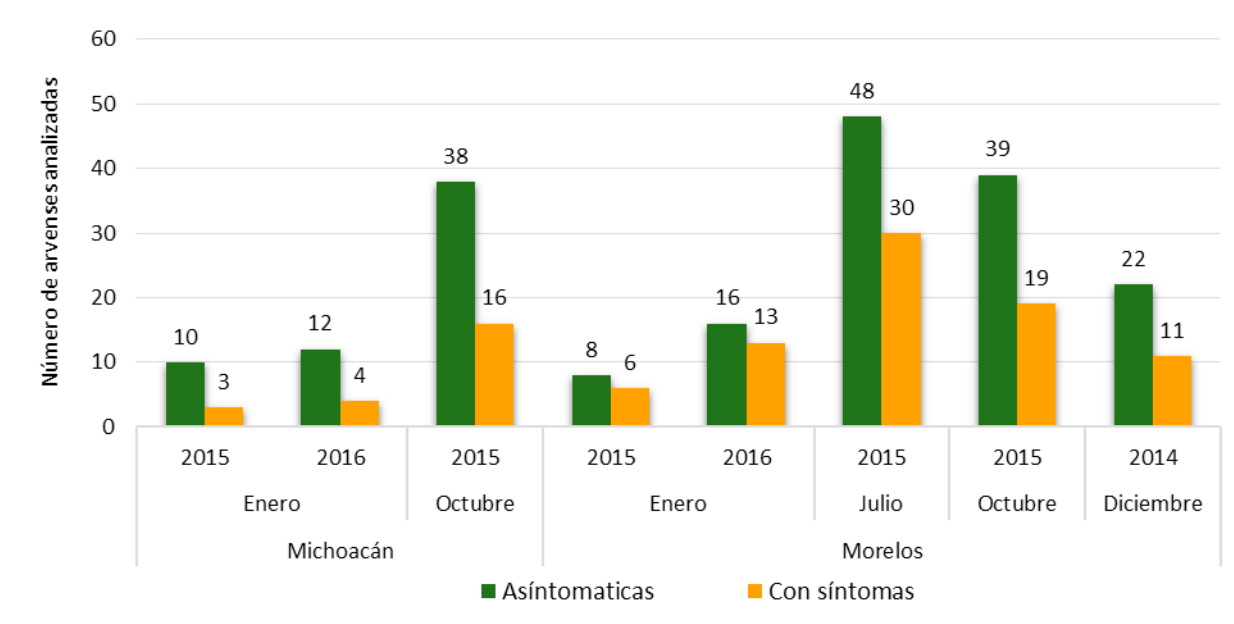


Figura 3. Arvenses colectadas con síntomas sospechosos de virosis y plantas asintomáticas para el análisis de *Iris yellow spot virus* por DAS-ELISA, en los estados de Michoacán y Morelos, México.

Figure 3. Weeds collected with possible virosis symptoms and asymptomatic plants for the analysis of *Iris yellow spot virus* for DAS-ELISA in the state of Michoacan and Morelos, Mexico.

plantas correspondieron al estado de Morelos y tres a Michoacán, seguido por *Acalypha ostryifolia*, *Amaranthus hybridus* y *Parthenium hysterophorus* pero en menor frecuencia. Por otro lado, de estas 75 arvenses, en el estado de Morelos se colectaron 19 arvenses cuando el cultivo de cebolla estaba establecida y 42 arvenses en ausencia del cultivo. En el caso de Michoacán, 11 arvenses con trips se colectaron en ausencia del cultivo y solo tres en presencia del cultivo (Figura 4). Cabe resaltar que se observó un incremento de las poblaciones de trips en las parcelas con presencia del cultivo de cebolla, principalmente en etapas fenológicas avanzadas (formación del bulbo).

Extracción de ADN y PCR

Se establecieron 75 colonias de trips procedentes del mismo número de plantas colectadas

DISCUSSION

The *Iris yellow spot virus* is an agriculturally important virus worldwide due to the damage it causes to species of the genus *Allium* (Bag *et al.*, 2009). To this day there have been numerous hosts infected naturally by this virus (Cosmi *et al.*, 2003; Sampagni *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2009b; Evans *et al.*, 2009a; Hsu *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012; Weilner and Bedlan, 2013; Schwartz *et al.*, 2014; Szostek and Schwartz, 2015; Karavina and Gubba, 2017), some of which were found in this study in the municipalities visited. In the state of Michoacan, samples were taken of *S. oleraceus*, *S. nigrum*, *C. album*, *L. serriola*, *Amaranthus sp.* and *P. oleracea*, along with *R. communis*, *Amaranthus sp.* and *P. oleracea* in Morelos, which have been reported as IYSV hosts naturally when analyzed by DAS-ELISA (Schwartz *et al.*, 2014; Karavina

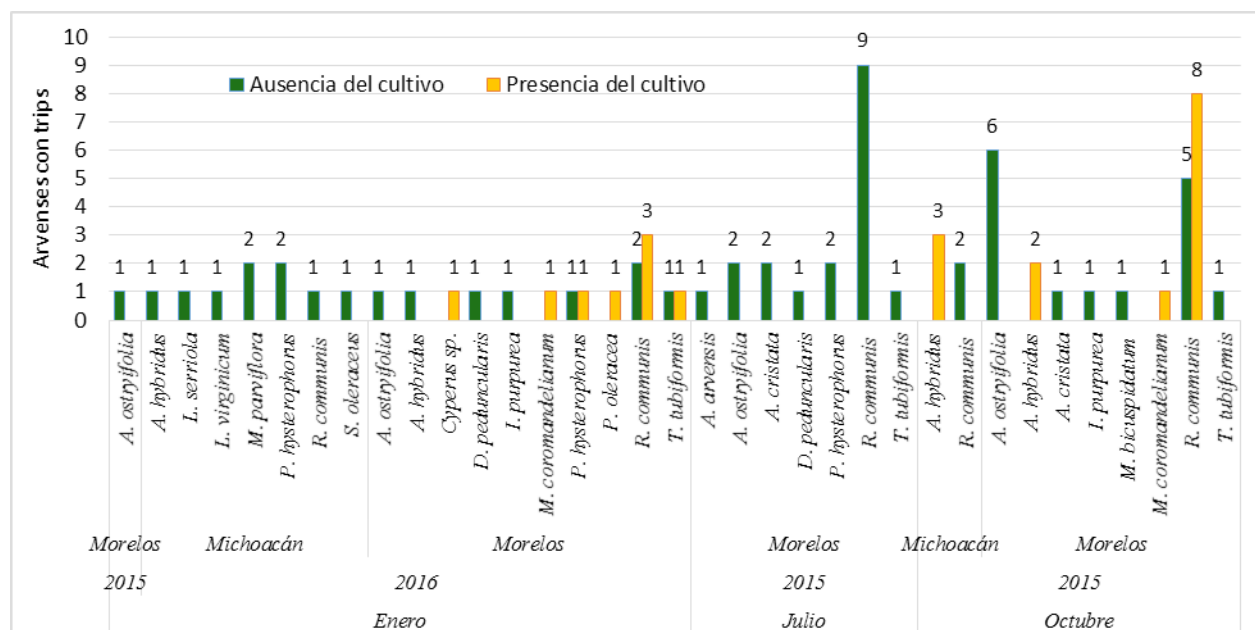


Figura 4. Arvenses con presencia de trips (adultos y/o inmaduros) en diferentes tiempos de muestreo, en presencia y ausencia del cultivo de la cebolla en los estados de Morelos y Michoacán, México.

Figure 4. Weeds with thrips (adult and/or immature) in different sampling times, in the presence and absence of onion crops in the state of Morelos and Michoacan, Mexico.

en Morelos y Michoacán. Del total de colonias establecidas, solo 33 lograron incrementar su población (25 de Morelos y ocho de Michoacán). En todos los casos se obtuvo el amplicón esperado de 710 pb y sus secuencias presentaron una identidad de 97 al 100 % para *Thrips tabaci* (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Iris yellow spot virus es un virus de importancia agrícola en el mundo por los daños que ocasiona a especies del género *Allium* (Bag *et al.*, 2009). A la fecha se han reportado numerosos hospedantes infectados de forma natural por este virus (Cosmi *et al.*, 2003; Sampagni *et al.*, 2007; Evans *et al.*,

and Gubba, 2017). The greatest diversity and frequency of weeds was observed in Morelos, unlike Michoacan, since most of the fields sampled in Michoacan had plastic mulch, controlling the weeds in the fields, along with the farmers weeding and/or spraying herbicides more frequently than in Morelos (data not shown).

Despite the information reported internationally of alternate hosts with the presence of the virus, the range of hosts in Mexico is still unknown. Up to now, the presence of IYSV by DAS-ELISA has only been reported in *Amaranthus* spp., *Bidens odorata*, *Brassica campestris*, *Chenopodium* spp., *Eruca sativa*, *Malva parviflora*, *Medicago sativa*, *Sisimbrio* spp. and *S. oleraceus* in the onion-producing areas of Zacatecas; however, the authors

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.
Table 2. Thrips colonies collected from different weed species and identified by PCR COI in onion-producing regions of the states of Morelos and Michoacan.

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) / Ay: Ayala, Mor.; Pi: Puente de Ixtla, Mor.; Ez: Emiliano Zapata, Mor. Ax: Axochiapan, Mor.; Vh: Vista Hermosa, Mich.; Ta: Tanhuato, Mich; I: winter (January 2016); V: summer (July 2015); O: autumn (October 2015).

2009b; Evans *et al.*, 2009a; Hsu *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012; Weilner y Bedlan, 2013; Schwartz *et al.*, 2014; Szostek y Schwartz, 2015; Karavina y Gubba, 2017), de las cuales algunas fueron encontradas en el presente estudio en los municipios recorridos. En el estado de Michoacán se colectaron *S. oleraceus*, *S. nigrum*, *C. album*, *L. serriola*, *Amaranthus sp.* y *P. oleracea*; así como, *R. communis*, *Amaranthus sp.* y *P. oleracea* en Morelos, mismas que han sido reportadas como hospedantes de IYSV en forma natural al analizarlas por DAS-ELISA (Schwartz *et al.*, 2014; Karavina y Gubba, 2017). La mayor diversidad y frecuencia de arvenses se observó en Morelos, no así para Michoacán, esto debido a que la mayoría de las parcelas muestreadas en Michoacán tenían acolchado, controlando las arvenses entre el cultivo; además, de que los productores realizan deshierbes y/o aplican herbicidas con mayor frecuencia que en Morelos (datos no mostrados).

A pesar de la información reportada internacionalmente de los hospedantes alternos con presencia del virus, en México aún se desconoce el rango de hospedantes. Hasta el momento solo se ha 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 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. Cabe resaltar que aunque en nuestro estudio también se confirmó la presencia del virus en el cultivo de la cebolla, tanto en Morelos y Michoacán durante los ciclos otoño-invierno

do not specify the number of plants evaluated or positive samples for the virus (Velásquez-Valle *et al.*, 2013). In the case of the state of Morelos Ramírez-Rojas *et al.* (2016) reported a total incidence and a severity of over 90 % of the virus in onion-producing areas, yet they did not evaluate the presence of the virus in weeds. It is worth pointing out that although our study also confirmed the presence of the virus in the onion crop, both in Morelos and Michoacan during the autumn-winter cycles of 2014 and 2015, the analysis was also carried out in the weeds related to the crop and no samples were positive for IYSV.

One of the possible causes to explain why the virus was not found in the weeds analyzed is that it is a localized virus, i.e., it is not systemic, making it more difficult to detect when performing serological tests such as DAS-ELISA (Gent *et al.*, 2006), and even RT-PCR. This has been shown in the case of onion, where its distribution of the virus in the plant is heterogenous, which can give false negatives, leading to an underestimation of its incidence (Hsu *et al.*, 2010). On the other hand, the symptoms caused by the IYSV do not tend to be consistent and clear, therefore, when taking plant tissue samples for their analysis with RT-PCR and/or DAS-ELISA results may be inconsistent (Krauthausen *et al.*, 2012). This expression of symptoms is influenced by the period of incubation, the phenology of the plant at the moment of infection, weather conditions, the level of stress in the plant, as well as in the cultivar (Bag *et al.*, 2012). Likewise, Ochoa *et al.* (1996) point out that obtaining negative samples in weeds does not imply that they are not a reservoir for the virus. It is also possible that during the weed collection dates, the viral content was not detectable with ELISA, since the time of inoculation by thrips was unknown. In addition to this, to date there is no knowledge of the times of acquisition and transmission of IYSV

de 2014 y 2015, también se realizó el análisis en las arvenses asociadas al cultivo y ninguna muestra resultó positiva para IYSV.

Una de las posibles causas del porque el virus no se detectó en las arvenses analizadas, se debe a que es un virus localizado; es decir, no es sistémico, lo que dificulta su detección al momento de hacer pruebas serológicas como DAS-ELISA (Gent *et al.*, 2006) e incluso RT-PCR. Esto se ha demostrado en el caso de la cebolla, donde su distribución del virus en la planta es heterogénea lo que puede dar falsos negativos tendiendo a subestimar su incidencia (Hsu *et al.*, 2010). Por otro lado, los síntomas ocasionados por IYSV no suelen ser consistentes y claros, por lo que al momento de tomar muestras de tejido vegetal para su análisis por RT-PCR y/o DAS-ELISA pueden tenerse resultados inconsistentes (Krauthausen *et al.*, 2012). Dicha expresión de síntomas es influenciado por el período de incubación, la fenología de las plantas al momento de la infección, las condiciones climáticas, nivel de estrés en la planta así como del cultivar (Bag *et al.*, 2012). Así mismo, Ochoa *et al.* (1996) señalan que obtener muestras negativas en arvenses no implica 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 ELISA debido a que se desconoce el tiempo de inoculación por los trips. Aunado a ello, a la fecha se desconocen los períodos de adquisición y transmisión de IYSV por *T. tabaci* en las arvenses (Smith *et al.*, 2011). En nuestro estudio también se evaluaron por RT-PCR las arvenses más abundantes, y plantas de chile, jitomate y tomate de cascara (datos no publicados) que fueron sembrados posterior a la cosecha de la cebolla, pero ninguna amplificó la banda para el IYSV. Se debe de considerar que el tejido seleccionado para el análisis quizá no contenía el virus. No obstante, se ha reportado su comportamiento sistémico en *N. benthamiana*, transmitida

by *T. tabaci* in the weeds (Smith *et al.*, 2011). Using RT-PCR, our study also evaluated the most abundant weeds, along with chili pepper, tomato, and tomatillo plants (data not published) that were planted after the harvest of onion, although none amplified the band for IYSV. We must consider that the tissue chosen for the analysis may not have contained the virus. However, its systemic behavior has been reported in *Nicotiana benthamiana*, transmitted mechanically (Kritzman *et al.*, 2001; Bag *et al.*, 2012). These data correspond with our results in the same host, where it showed systemic symptoms after the IYSV inoculation, chlorotic stains in young leaves (non-inoculated area), and necrosis followed by the death of the plant. So far there are no records of IYSV being transmitted through seeds (Kritzman *et al.*, 2001), although its presence has been observed in onion seedbeds (Velásquez-Valle *et al.*, 2016) in Zacatecas; it is a source of inoculants in these seedbeds and has increased the interest of the study of the ecology of this virus in our entity, since the behavior of the virus in different hosts, vectors, and weeds, can vary.

In regards to thrips, both states showed the greatest presence of insects in weeds in the absence of the crop, and mainly immature states were observed in the vegetative sections of plants, which indicates that these plants can be thrips reservoirs. In fields with onions, few weeds with thrips were gathered, despite the onion plants having large populations of these insects, mainly in advanced phenological stages of the crop. Szostek and Schwartz (2015) recorded the presence of IYSV vector thrips in the absence of the crop in different weeds. This information can back up our data, since larger thrips populations were observed in the absence of the crop. It has been suggested that in the absence of the crop the thrips move to nearby plants and reproduce in them, whether in the vegetative

de forma mecánica (Kritzman *et al.*, 2001; Bag *et al.*, 2012). Estos datos concuerdan con nuestros resultados en el mismo hospedante, donde mostró síntomas sistémicos después de la inoculación del IYSV, manchas cloróticas en hojas jóvenes (zona no inoculada), necrosis y posteriormente la muerte de la planta. Hasta el momento no se tiene registros de IYSV transmitido por semilla (Kritzman *et al.*, 2001), pero si se ha observado su presencia desde almácigos de cebolla (Velásquez-Valle *et al.*, 2016) en Zacatecas, siendo una fuente de inóculo en dichos almácigos y aumentando el interés del estudio de su ecología de este virus en nuestra entidad, ya que el comportamiento del virus en diferentes hospedantes, vector y arvenses puede llegar a variar.

Con lo que respecta a los trips, en ambos estados se observó la mayor presencia de los insectos en arvenses en ausencia del cultivo, observándose principalmente estados inmaduros en las partes vegetativas de las plantas, lo cual nos indica que estas plantas pueden ser reservorio de los trips. En las parcelas con presencia del cultivo de cebolla, se colectaron pocas arvenses con presencia de trips, a pesar de que las plantas de cebolla tenían altas poblaciones de estos insectos, principalmente en etapas fenológicas avanzadas del cultivo. Szostek y Schwartz (2015) registraron la presencia de trips vectores de IYSV en ausencia del cultivo en diferentes arvenses. Esta información puede respaldar nuestros datos, al observarse mayores poblaciones de trips en ausencia del cultivo. Se ha sugerido que en ausencia del cultivo, los trips se mueven a plantas aledañas a éste y se reproducen en ellas, ya sea en las partes vegetativas o preferentemente en las inflorescencias (Milne y Walter, 1998). Si bien varias arvenses no se han reportado como hospedantes de IYSV, se sabe que algunas de ellas son hospedadoras de trips, por lo que resulta importante su consideración en campo como parte de un estudio epidemiológico para el manejo de la enfermedad

sections or preferably in the inflorescences (Milne and Walter, 1998). Although several weeds have not been reported to host IYSV, it is known that some of them are thrips hosts, therefore it is important to consider them in the field as part of an epidemiological study for the management of the disease (Smith *et al.*, 2011). The abundance of weeds with thrips in the state of Morelos (13 weed species), compared to the state of Michoacan (7 weed species), can be an important explanation of the problem caused by this disease in this entity, since weeds host thrips with a possible potential of being viral transmitters. The way in which weeds are eliminated in Michoacan may be the main factor behind the low thrips populations in onion plants (data not published), even under the low records of weeds with thrips populations in Michoacan (14 weeds), in comparison with the state of Morelos (61 weeds).

In *R. communis* and *A. ostryifolia* alone, the greatest presence of thrips in immature and adult stages was observed, mainly in the state of Morelos. In the case of *R. communis*, this result differs from a report by Schwartz *et al.* (2014), who found this species hosts IYSV, but not *T. tabaci*. Although they are different entities, this weed cannot be discarded as a possible reservoir of the virus and the insect, since our data showed it is the main host for *T. tabaci*. Despite the virus not being found in *R. communis*, its study must not be underestimated in these and other weeds, mainly where the insect, the only IYSV vector under field conditions, procreates.

Only *T. tabaci* has been reported as highly transmitting of the virus (Gent *et al.*, 2004; Díaz-Montano *et al.*, 2011). In Mexico it is found in onion plantations (Velásquez-Valle *et al.*, 2011), but only García-Rodríguez *et al.* (2014) confirmed the presence of the virus in *T. tabaci* in garlic plantations. All the thrips collected from

(Smith *et al.*, 2011). La abundancia de arvenses con presencia de trips en el estado de Morelos (13 especies de arvenses) comparado con el estado de Michoacán (7 especies de arvenses), puede ser una explicación importante de la problemática que se tiene de esta enfermedad en esta entidad, al servir las arvenses como hospederos de los trips 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 (datos no publicados), inclusive el bajo registro de arvenses con poblaciones de trips en Michoacán (14 arvenses), comparado con el estado de Morelos (61 arvenses).

Solo en *R. communis* y *A. ostryifolia* se observaron mayor presencia de trips en estado inmaduro y adulto, principalmente en el estado de Morelos. En el caso de *R. communis*, este resultado difiere de lo reportado por Schwartz *et al.* (2014), quienes encontraron a esta especie como hospedante de IYSV pero no de *T. tabaci*. Si bien son entidades diferentes, no se debe descartar dicha posibilidad de esta arvense como reservorio del virus y del insecto, ya que nuestros datos mostraron ser el hospedante principal de *T. tabaci*. Pese a que no se detectó el virus en *R. communis*, no se debe de subestimar su estudio en esta y demás arvenses, principalmente donde se reproduce el insecto, que hasta el momento es el único vector de IYSV bajo condiciones de campo.

Se ha reportado solo a *T. tabaci* con alta eficiencia de transmisión del virus (Gent *et al.*, 2004; Díaz-Montano *et al.*, 2011). En México se tiene su presencia en el cultivo de cebolla (Velásquez-Valle *et al.*, 2011), pero solo García-Rodríguez *et al.* (2014) confirmaron la presencia del virus en *T. tabaci* localizados en el cultivo de ajo. Todos los trips colectados de las diferentes arvenses que se lograron aumentar su población, correspondieron

the different weeds that managed to increase their population corresponded to *T. tabaci*; however, if they were carriers of the virus or not was not determined, although these plants are considered important thrips reservoirs, which can be potential in the spreading of IYSV in onion plantations (Jones, 2005). The transovarian transmission of IYSV has not yet been proven in thrips, therefore the individuals of each generation must acquire the virus to be able to transmit it (Weilner and Bedlan, 2013), increasing the interest in the behavior of the ecology of the virus.

As mentioned earlier, many of these vector insects can reproduce successfully in diverse unplanted species. These data indicate that thrips can remain indefinitely in a particular area, even in the absence of onion plants. An adequate control of weeds before the increase of thrips populations could reduce their migration (Chatzivassiliou *et al.*, 2007) or their movement to voluntary onion plants (Ghotbi *et al.*, 2005) which can act as an IYSV reservoir outside the crop's cycle, increasing the possibility of early infections in the following cycle (Hsu *et al.*, 2011). Our data are backed up by what we mentioned earlier, concerning the handling of weeds in the state of Michoacan in contrast to the state of Morelos, which may explain the prevalence of high thrips populations of Morelos, since they have more alternate hosts in the absence of onion plants, their main host. In the state of Morelos there is not an adequate management of weeds, and in many of them, the presence of *T. Tabaci* in immature stages was found. We also found large thrips populations in onion plants.

Our data suggest that the difference in the intensity of the disease observed in both states can be due to the diversity and frequency of weeds found in Morelos, with the consequence of higher thrips populations. Also, in the state of Michoacan, a better management of weeds and crops was

a *T. tabaci*; sin embargo, no se determinó si eran portadoras del virus, pero, se considera de importancia estas plantas como reservorios de los trips, mismos que pueden ser potenciales en la dispersión del IYSV en el cultivo de la cebolla (Jones, 2005). Aún no se ha demostrado la transmisión transovárica de IYSV en trips por lo que los individuos de cada generación deben adquirir al virus para poder transmitirlo (Weilner y Bedlan, 2013). Aumentando el dicho interés en su comportamiento de la ecología del virus.

Como ya se mencionó, muchos de estos insectos vectores pueden reproducirse exitosamente en diversas especies no cultivadas. Estos datos indican que los trips pueden permanecer indefinidamente en determinada zona aún en ausencia del cultivo de cebolla. El adecuado control de las arvenses antes del aumento de las poblaciones de trips, podría reducir su migración (Chatzivassiliou *et al.*, 2007) o su movimiento a plantas voluntarias de cebolla (Ghotbi *et al.*, 2005) que pueden servir de reservorio de IYSV fuera del ciclo del cultivo, aumentando la posibilidad de infecciones tempranas en el siguiente ciclo (Hsu *et al.*, 2011). Nuestros datos son respaldados por lo anteriormente mencionado, que ante el manejo que se tiene de las arvenses en el estado de Michoacán en contraste con el estado de Morelos, puede explicar la prevalencia de las altas poblaciones de trips que existe en Morelos al tener mayor número de hospedantes alternos ante la ausencia del hospedante principal, la cebolla. En el estado de Morelos no se tiene un manejo adecuado de las arvenses y muchas de ellas se detectó la presencia de estados inmaduros de *T. tabaci*. Además de observarse altas poblaciones de trips en el cultivo de la cebolla.

Nuestros datos sugieren que la diferencia en la intensidad de la enfermedad que se tiene en ambos estados, puede deberse a la diversidad y frecuencia

observed, such as rotation, with the consequential reduction in weeds and thrips, as well as low populations of this insect in the crop. Regardless of our study not determining the presence of the virus in the thrips obtained from the weeds, it is known to be the main vector, and considering the wide range of *T. tabaci* hosts in these entities, it can be important in the epidemiology of IYSV.

Our work has confirmed the presence of IYSV in the state of Michoacan, where it has not been reported before. Likewise, the presence of *T. tabaci* in several weeds of both states suggests the importance as hosts of the insect in the absence of the crop, mainly those located on the edges of the fields and the possibility of being IYSV hosts in the future. Taking this into account, having a broad knowledge of these interactions would help obtain better crop management strategies. Likewise, limiting studies to just the species of weeds in which the vector reproduces, or carrying out mechanical transmission tests on these weeds, as well as virus transmission tests on the thrips collected from the weeds, we could obtain concise data to understand the virus epidemic in onion crops in an efficient way.

CONCLUSIONS

This study did not find the *Iris yellow spot virus* in the species of weeds collected in fields with or without onion crop in Morelos and Michoacan; however *T. tabaci* was identified as the only species in 13 species of weeds collected in Morelos and seven collected in Michoacan as alternate hosts of the IYSV putative vector. These weeds play an important role in the intensity of the disease, since they are *T. tabaci* reservoirs, and are more frequent in Morelos than in Michoacan.

de arvenses que se tiene en la entidad de Morelos, teniendo como consecuencia, mayores poblaciones de trips. Además, en el estado de Michoacán, se observó un mejor manejo de las arvenses y del cultivo, como la rotación, observándose baja diversidad de arvenses y trips, así como bajas poblaciones del insecto en el cultivo. Pese que en nuestro estudio, no se determinó la presencia del virus en los trips obtenidos de las arvenses, se sabe que es el principal vector, y al conocer el amplio rango de hospedantes de *T. tabaci* en estas entidades, puede ser importante en la epidemiología de IYSV.

Este trabajo ha confirmado la presencia de IYSV en el estado de Michoacán, donde no se ha reportado previamente. Así mismo, la presencia de *T. tabaci* en varias arvenses de ambos estados, nos sugiere la importancia como hospederos del insecto 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. Ante lo mencionado, el tener un amplio conocimiento de dichas interacciones ayudaría a obtener mejores estrategias de manejo del cultivo. Así mismo, confinar los estudios solo a las especies de arvenses donde se reproduce el vector o hacer pruebas de transmisión mecánica en dichas arvenses, así como pruebas de transmisión del virus en los trips recolectados de las arvenses, podríamos obtener datos concisos para entender de forma eficiente la epidemia del virus en el cultivo de cebolla.

CONCLUSIONES

En este estudio no se detectó la presencia de *Iris yellow spot virus* en las especies de arvenses recolectadas durante los muestreos en parcelas con o sin cultivo de cebolla, en Morelos y Michoacán; sin embargo, se identificó como única especie a *T. tabaci* en 13 especies de arvenses recolectadas en

ACKNOWLEDGEMENTS

The main author wished to thank CONACyT for the scholarship granted for the completion of his doctoral studies. To the trusteeship Num. 167304 granted for the scientific research and technological development of the Colegio de Postgraduados, as well as the collaboration of M. C. Juan Carlos Delgado Castillo, specialist in weeds of the Plant Health Program, SAGARPA, Guanajuato.

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

Morelos y siete en Michoacán como hospedantes alternos del putativo vector de IYSV. Estas arvenses juegan un papel importante en la intensidad de la enfermedad, al ser reservorios de *T. tabaci*, observándose mayor frecuencia de arvenses en Morelos comparado con Michoacán.

## AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece a CONACyT por la beca otorgada para realizar el doctorado. Al Fideicomiso No. 167304 otorgado por la Investigación científica y desarrollo tecnológico del Colegio de Postgraduados, así mismo la colaboración del M. C. Juan Carlos Delgado Castillo, especialista en arvenses del Programa de Sanidad Vegetal, SAGARPA, Guanajuato.

## LITERATURA CITADA

- 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. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-012-0026-1>
- 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 (4): 715-718. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-009-0349-1>
- Brewster JL. 2008. Onion and other vegetable allium. 2nd edition. CAB International. London UK 204p.

- Chatzivassiliou EK, Peters D and Katis NI. 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. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01302.x>
- Cosmi T, Marchesini E and Martini G. 2003. Presence and spread of *Tospovirus* and thrip vectors in Veneto. *Infomatore Agrario* 59:69-72. Disponible en línea: <http://www.cabi.org/ISC/abstract/20033086912>.
- Díaz-Montano J, Fuchs M, Nault BA, Fail J and Shelton AM. 2011. Onion Thrips (Thysanoptera: Thripidae): A global pest of increasing concern in onion. *Journal of Economic Entomology*. 104 (1): 1-13 <http://dx.doi.org/10.1603/EC10269>
- du Toit LJ, Burger JT, McLeod A, Engelbrecht M and Viljoen A. 2007. *Iris yellow spot virus* in onion seed crops in South Africa. *Diseases notes*. 91(9):1203. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1203A>
- Espinosa FJ y Sarukhán J. 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. 407p.
- Evans CK, Bag S, Frank E, Reeve JR, Ransom C, Drost D and Pappu HR. 2009a. Natural infection of *Iris yellow spot virus* in twoscale saltbush (*Atriplex micrantha*) growing in Utah. *Disease notes*. 93(4):430. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-93-4-0430C>.
- Evans CK, Bag S, Frank E, Reeve JR, Ransom C, Drost D and Pappu HR. 2009b. Green foxtail (*Setaria viridis*), a naturally infected grass host of *Iris yellow spot virus* in Utah. *Plant Disease* 93 (6): 670 <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0670C>.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R. 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. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7881515>.
- García-Rodríguez OG, Pérez-Moreno L, Navarro-León MJ, Salas-Araiza MD, Martínez-Jaime OA, León-Galván MF y Núñez-Palenius HG. 2014. Virus Fitopatógenos en insectos asociados al ajo. *Revista Chapingo serie Horticultura* 20(2):147-156. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.10057>
- 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 (12): 1468-1480. <http://dx.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(5): 446-452. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.446>
- Ghotbi T, Shahraeen N and Winter S. 2005. Occurrence of *Tospoviruses* in ornamental and weed species in Markazi and Tehran provinces in Iran. *Plant Disease* 89: 425-429. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0425>.
- Hsu CL, Hoepting CA, Fuchs M, Shelton AM and Nault BA. 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. <http://dx.doi.org/10.1603/EN09165>.
- Hsu CL, Hoepting CA, Fuchs M, Smith EA and Nault BA. 2011. Sources of *Iris yellow spot virus* in New York. *Plant Disease* 95:735-743. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0353>
- Jones DR. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology*. 113:119-157. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-005-2334-1>.
- Karavina C and Gubba A. 2017. *Amaranthus* sp. and *Eleusine indica* are natural host of *Iris yellow spot virus* in Zimbabwe. *Disease notes*. *Plant Disease*. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0652-PDN>
- Krauthausen HJ, Leeinhos ME, Müller J, Radtke PC and Jehle JA. 2012. Identification and incidence of *Iris yellow spot virus* in Allium field crops in Southwest Germany. *European Journal of plant Pathology* 134:345-356. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-012-9993-5>.
- Kritzman A, Lampel M, Raccach B and Gera A. 2001. Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease*. 85:838-842. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.8.838>
- Milne M and Walter GH. 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. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-6055.1998.000017.x>.
- Ochoa MDL, Zavaleta-Mejía E., Johansen NRM, Herrera GA and Cardenas-Soriano E. 1996. *Tospoviruses*, weeds and thrips associated with chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Polaris). *International journal of Pest Management*. 42(3):157-159. <http://dx.doi.org/10.1080/09670879609371988>
- 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. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a3.pdf>
- Ramírez-Rojas S, Ornelas-Ocampo K, Osuna-Canizalez F de J, Bartolo-Reyes JC y Varela-Loza V. 2016. Detección de *Iris yellow spot virus* en cebolla cultivada en Tepalcingo, Morelos, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34 (3):308-315. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1604-1>.
- Rodríguez SP, Lindsey G and Fernandes PMB. 2007. Biotechnological approaches to the control of plant viruses. Pp. 126-138. *In* Thangadurai D, Tang W. and Song SQ (Eds.). *Plant stress and biotechnology*. 1st edition. Oxford Book Company. Jaipur, India. 257p.
- Rzedowski GC de y Rzedowski J. 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. 975p. Disponible en línea: [http://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Flora\\_del\\_Valle\\_de\\_Mx1.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Flora_del_Valle_de_Mx1.pdf)
- Rzedowski GC de y Rzedowski J. 2004. 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. Disponible en línea: <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/ComplementarioXX.pdf>
- Sampangi RK and Mohan SK. 2007. Identification of new alternative weed hosts for *Iris yellow spot virus* in the Pacific Northwest. Diseases note. 91(12):1683. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-12-1683B>.
- Schwartz HF, Gent DH, Fichtner SM, Otto K, Boateng CO, Szostek S, Cranshaw WS and Mahaffey LA. 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. <http://dx.doi.org/doi:10.1603/EN10246>.
- Smith EA, DiTommaso A, Fuchs M, Shelton AM and Nault BA. 2012. Abundance of weed hosts as potential sources of onion and potato viruses in western New York. Crop Protection. 37:91-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.007>.
- Smith EA, DiTommaso A, Fuchs M, Shelton AM and Nault BA. 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. <http://dx.doi.org/10.1603/EN10246>.
- Sutula CL, Gillett JM, Morrissey SM and Ramsdell DC. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. Plant Disease. 70 (8): 722-726. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n08\\_722.pdf](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n08_722.pdf).
- Syller J. 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. Molecular plant pathology. 13(2): 204-216. <http://dx.doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00734.X>.
- Szostek AS and Schwartz HF. 2015. Overwintering sites of *Iris yellow spot virus* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in Colorado. Southwestern Entomologist. 40(2): 273-290. <http://dx.doi.org/10.3958/059.040.0204>.
- 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. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263121473013>
- 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. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342013000800012](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342013000800012)
- Velásquez VR, Reveles TLR, Salas MS, Mauricio CJA and Pappu HR. 2016. First Confirmed Report of *Iris yellow spot virus* in Onion Nurseries in Zacatecas, México. Plant Disease <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-01-16-0061-pdn>
- Vibrans H and Tenorio LP. 2012. Malezas de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (Conabio). [www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm](http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm). (Consulta, año 2016).
- Weilner S. and Bedlan G. 2013. Detection of *Iris yellow spot virus* (IYSV) in selected *Allium* species and overwintering host in Austrian onion-producing areas. Journal für Kulturflanzen. 65(2):60-67. <http://dx.doi.org/DOI 10.5073/JfK.2013.02.3>.