

Iris yellow spot virus (IYSV): nuevo virus en el cultivo de la cebolla en España

C. CÓRDOBA SELLÉS, L. MARTÍNEZ PRIEGO, R. M. MUÑOZ GÓMEZ, M. L. LERMA TOBARRA, C. JORDÁ GUTIÉRREZ

Recientemente ha sido detectada una nueva enfermedad en el cultivo de la cebolla causada por la infección por un nuevo Tospovirus, el Iris yellow spot virus (IYSV). Las plantas afectadas presentan manchas de coloración verde-amarillenta o blanquecinas en forma de huso en las hojas que evolucionan a una desecación prematura, iniciándose los daños por los extremos y comenzando por las hojas más viejas. Asimismo, los bulbos presentan disminución de calibre. La identificación se ha llevado a cabo mediante serología (DAS-ELISA) de extractos de hojas de plantas con síntomas utilizando antisueros específicos contra IYSV. Los resultados obtenidos fueron verificados mediante RT-PCR, utilizando unos cebadores específicos del gen de la nucleocápsida del IYSV, obteniéndose una banda de aproximadamente 790 pb. cuya identidad fue confirmada por secuenciación y comparación de esta secuencia con la depositada en la base de datos del Genbank (AB121026) encontrándose un porcentaje de similitud del 97% entre ambas. Según nuestros datos es la primera cita de este virus en nuestro país.

R. M. MUÑOZ GÓMEZ y M. L. LERMA TOBARRA: Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF). Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP). Apartado Postal 451. 02080 Albacete.

C. CÓRDOBA SELLÉS, L. MARTÍNEZ PRIEGO, C. JORDÁ GUTIÉRREZ: Departamento de Patología Vegetal- Unidad de Virología. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022 Valencia.

Palabras clave: Diagnosis, *Thrips tabaci*, *Allium cepa*, Tospovirus, RT-PCR, Serología.

INTRODUCCIÓN

En la provincia de Albacete, la introducción de nuevas técnicas de riego y la explotación de acuíferos subterráneos han posibilitado que la superficie de regadío se haya incrementado de forma importante en los últimos veinticinco años. Los cultivos hortícolas extensivos han mostrado una importante expansión en la provincia, destacando el cultivo de la cebolla (*Allium cepa* L.). La provincia de Albacete es la mayor productora de este cultivo, con unas 4000 has cultivadas y 250.000 toneladas en el año 2003.

Durante el verano del año 2003 se detec-

taron en cultivos de cebolla de la provincia de Albacete plantas que se desecaban de forma prematura, iniciándose los daños por los extremos de las hojas y en las más adultas; como consecuencia, las plantas quedaban con escasa superficie sintetizadora, y con los bulbos apenas engrosados, de poco calibre. En las zonas foliares que todavía no se habían secado se observaban manchas blanquecinas con forma de huso y manchas con anillo.

La sintomatología observada no se correspondía con los aspectos sintomatológicos observados en cebolla en años anteriores, donde se había diagnosticado el virus del

enanismo amarillo de la cebolla (Onion yellow dwarf virus, OYDV) en la mayor parte de las muestras analizadas y el virus del Bronceado del tomate (Tomato spotted wilt virus, TSWV), y del rayado amarillo del puerro (Leek yellow stripe virus, LYSV) en tan sólo unas pocas muestras analizadas.

Los diagnósticos efectuados desestimaron, así mismo, la asociación de los síntomas descritos con algún tipo de plaga o enfermedad causada por hongos, nematodos o bacterias.

En la bibliografía se describen daños similares en cebolla en otras zonas del mundo asociados a la infección de un virus perteneciente al grupo de los Tospovirus, Familia Bunyaviridae, el *Iris yellow spot virus* (IYSV).

En 1991 se describió en Estados Unidos una nueva enfermedad en cebolla (HALL *et al.*, 1993) que más tarde se diagnosticó como un aislado del IYSV. Este virus era el causante de una enfermedad potencialmente devastadora y de amplia distribución en este cultivo en la zona oeste de Estados Unidos (GENT *et al.*, 2004). Actualmente se considera endémico en Colorado, Washington, Idaho, Oregón, Utah, California, Arizona, Nevada y Nuevo México (EPPO, 2004). La enfermedad en Israel, en 1997, era conocida por los cultivadores de cebolla como “straw bleaching”, debido a la decoloración pajiza que presentaban las hojas de las plantas enfermas, citándose incidencias entre el 50-60% con importantes pérdidas en la producción de bulbos, siendo diagnosticado el agente causal como *Iris yellow spot virus* (GERA *et al.*, 1998). En Brasil se describía una enfermedad en este cultivo con el nombre de “sapeca”, que provocaba una disminución de la producción de bulbos y semillas, pudiendo alcanzar una incidencia del 100% (POZZER *et al.*, 1994), pero fue algo más tarde cuando se asoció a la presencia del IYSV (POZZER *et al.*, 1999). El virus fue identificado de forma ocasional en *Iris hollandica* Tub en Holanda (DERKS y LEMMERS, 1996) y en puerro (*Allium porrum* L.) (GERA *et al.*, 1998). La sintomatología observada en *Iris* fue asociada a la presencia

de un nuevo Tospovirus, el *Iris yellow spot virus* (CORTES *et al.*, 1998). También ha sido detectado en los cultivos de puerro y cebolla en Irán (SHAHRAEEN y GHOTBI, 2003), Australia (COUTTS *et al.*, 2003) y Eslovenia (EPPO, 2004).

Desde 1999, el IYSV, está incluido en la lista de alerta de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (EPPO), al ser un peligro potencial para los cultivos de iris y cebolla, dado que su vector, *Thrips tabaci* (KRITZMAN *et al.*, 2001a; NAGATA *et al.*, 1999) está ampliamente distribuido (EPPO, 2004) y la enfermedad está asociada con presencia en campo de elevadas poblaciones del mismo (GERA *et al.*, 1997; KRITZMAN *et al.*, 2001b). Estudios llevados a cabo en Israel señalan que un 45% de los trips de la cebolla son portadores del virus (KRITZMAN *et al.*, 2001a), presentando una eficiencia de entre el 33 y 50% en la transmisión del virus (KRITZMAN *et al.*, 2001b). No ha sido demostrado que esta virosis pueda ser transmitida por el trips de las flores (*Frankliniella occidentalis*) (KRITZMAN *et al.*, 2001a). Así como tampoco ha sido demostrada la transmisión a través de la semilla (KRITZMAN *et al.*, 2001b).

Los síntomas foliares descritos en la bibliografía para esta enfermedad incluyen lesiones de color pajizo marrón claro y secas, con forma de huso o de diamante en cebolla (*A. cepa*), puerro (*A. porrum*) y cebollino inglés (*Allium fistulosum* L.). Algunas lesiones tienen el centro verde, con bordes amarillentos o de color marrón claro; otras lesiones aparecen como anillos concéntricos o alternando coloraciones de tejidos verdes y amarillos o marrón claro (SCHWARTZ *et al.*, 2003). Estas lesiones contribuyen a una temprana senescencia foliar (PELTER, 2001), pudiendo también aparecer manchas en el escapeo floral (SCHWARTZ *et al.*, 2003). La infección ha sido detectada en cultivos de cebollas tiernas, así como en cultivos de cebollas para semilla y bulbos (COUTTS, 2003). Las plantas infectadas pueden aparecer diseminadas o presentarse de forma generalizada (SCHWARTZ *et al.*, 2003).

Los campos muy afectados presentan una sintomatología similar a la causada por la podredumbre basal producida por *Fusarium*, pero no se observa podredumbre de las raíces ni del bulbo (PELTER, 2001).

En el cultivo de la cebolla la enfermedad está asociada a una reducción general del tamaño del bulbo (GENT *et al.*, 2004). Su incidencia a menudo alcanza porcentajes de 50 ó 60%, produciendo elevadas pérdidas de producción de bulbos (KRITZMAN *et al.*, 2001a). Según OCKEY y THOMSON (1994), plantas de cebolla infectadas son capaces de producir bulbos de buena calidad en algunos casos, aspecto aparentemente contradictorio con lo expuesto anteriormente; estos autores, sin embargo, indican que la infección hace tremendamente susceptibles a las plantas a condiciones adversas como sequía, exceso de riego y temperaturas muy altas; bajo esas situaciones desfavorables las porciones aéreas de las plantas mueren y se paraliza el engorde de los bulbos.

El presente trabajo recoge los estudios realizados para establecer el posible agente causal de la sintomatología que durante el verano del 2003 apareció en los cultivos de cebolla en la zona de Albacete.

MATERIAL Y MÉTODOS

En Septiembre de ese año se recogieron tres plantas enteras de cebolla que presentaban la sintomatología descrita en las hojas (Figs. 1 y 2). Dichas plantas fueron analizadas por técnica serológica E.L.I.S.A. (DAS-ELISA) utilizándose extractos de hojas de dichas plantas frente a los antiseros policlonales del Onion yellow dwarf virus (OYDV), Leek yellow stripe virus (LYSV), Cucumber mosaic virus (CMV) (Biorad Phyto-Diagnostics, Marnes-La Coquette, France. Catalog nº: 51237, 51228, 51219); Iris yellow spot virus (IYSV) y Tomato spotted wilt virus (TSWV) (Loewe Biochemica Sauerlach, Germany. Catalog. nº: 07508, 075011). Se siguieron los protocolos indicados por las propias casas comerciales, utilizando como testigo negativo tejido de cebolla sana. Los



Figura 1. Plantas con manchas e inicio de marchitamiento de hojas externas.

testigos positivos fueron suministrados así mismo por las propias casas comerciales.

Para confirmar los resultados obtenidos por serología se procedió a la extracción del ARN viral de las muestras de cebolla con síntomas, así como de las plantas sanas y del



Figura 2. Detalle de las manchas de color pajizo.

testigo positivo del IYSV suministrado en esta ocasión por DSMZ Plant Virus Collection (Braunschweig, Germany; Catalog. n° PV-0528), utilizando el kit de extracción RNA Wiz (Ambion Catalog. n° 9736).

Con el ARN extraído se realizó una RT-PCR en un solo paso, utilizando el enzima SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen Life Technologies, Barcelona. Catalog. n° 10928-034), utilizando los cebadores específicos IYSV-1S y IYSV-1A, específicos del gen de la nucleocápsida del IYSV (COUTTS *et al.*, 2003), la amplificación se realizó en un termociclador Gen Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk). Los productos amplificados en la PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TBE 0,5X durante 2 horas a 80V y teñidos posteriormente con bromuro de etidio. El tamaño del fragmento obtenido se estableció mediante comparación con un marcador de pesos moleculares de ADN de 1-Kb DNA (Invitrogen Life Technologies)

Para establecer si la banda obtenida se correspondía con el IYSV, los productos amplificados, de las diferentes muestras analizadas, fueron purificados utilizándose el kit de purificación, High Pure Product Purification (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany. Catalog. n° 1-732-676), según el protocolo marcado por la casa suministradora. Los fragmentos una vez purificados fueron secuenciados en un secuenciador automático ABI-Prism y las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas con las secuencias del IYSV que figuran en la base de datos del NCBI Genbank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron valores serológicos altamente positivos frente al antisuero del IYSV, siendo absolutamente negativos para los otros virus ensayados.

Para confirmar los resultados obtenidos, se procedió, como ya hemos descrito, a la extracción del ARN viral y mediante RT-PCR se obtuvo un fragmento de 790 bp en las extracciones procedentes de plantas de

cebolla con síntomas, no obteniéndose ningún producto de amplificación de las plantas aparentemente sanas o del control (Fig. 3).

La secuenciación de dicho fragmento proporcionó la secuencia nucleotídica que presentaba un 97% de similitud con la secuencia contenida en el NCBI Genbank (Accesión AB121026) que corresponde con la secuencia del gen de la nucleocápsida del IYSV. Este resultado corrobora la detección del IYSV en las muestras de cebolla analizadas.

Como ya hemos dicho anteriormente, este virus está incluido en la lista de alerta de la EPPO y ésta es la primera cita de su presencia en nuestro país, aunque desconocemos su extensión. Se conoce muy poco sobre la epidemiología de este virus. Según se cita en la bibliografía, tiene una lista de hospedantes relativamente pequeña, está limitado a la familia de las Liliáceas, principalmente a especies del género *Allium*, cebolla (*A. cepa* L.), puerro (*A. porrum* L.), cebolla francesa (*A. schoenoprasum* L.), cebollino inglés (*A. fistulosum*), ajo (*A. sativum* L.) y algunas especies de flores similares al Iris (*Iris hollandica* Tub), Lisianthus (*Eustoma russellianum*) (KRITZMAN *et al.*, 2000) e *Hippe-*

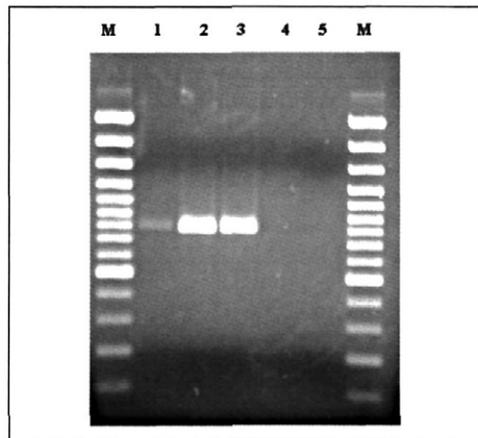


Figura 3. Detección del IYSV por RT-PCR. Columnas 1-2 corresponden a extractos de cebollas con síntomas, la columna 3 corresponde al control positivo de IYSV (DSMZ PV-0528), la columna 4 es de planta sana y la 5 el control. (M): 1Kb DNA ladder (Invitrogen Life Technologies).

astrum hybridum (KRITZMAN *et al.*, 2001). También ha sido encontrado en las plantas silvestres *Datura stramonium* y *Nicotiana benthamiana* (OCKEY y THOMSON, 1994).

Su vector transmisor, *Thrips tabaci* lo hace especialmente peligroso, dado que es una de las plagas más abundantes y frecuentes en el cultivo de la cebolla. En la provincia donde se ha diagnosticado el virus, Albacete, este insecto produce daños directos significativos en el cultivo de la cebolla, y su control conlleva tratamientos fitosanitarios repetidos a lo largo de toda la campaña. Por otra parte, hay datos referentes a que el virus alcanza los títulos más altos en las hojas interiores de esta planta, siendo precisamente el lugar preferido por este tisanóptero. Se desconoce si los ecotipos mediterráneos de este insecto serían eficientes en la transmisión de este tospovirus, ya que en el caso del TSWV, otro miembro de este grupo, no se han mostrado capaces de dicha transmisión pero se desconoce cual sería la situación para el nuevo virus. Este punto debería ser estudiado para evaluar el potencial peligro de esta nueva enfermedad, así como la extensión del virus en los cultivos sensibles al mismo.

Dado el resultado obtenido y hasta alcanzar el conocimiento de la importancia que puede haber adquirido en nuestras zonas de cultivo de cebolla, convendría aplicar aquellas medidas de control que han sido aconsejadas en las zonas de cultivo de otros países que nos han precedido en la infección por este nuevo miembro de los Tospovirus. El virus ha sido detectado en plantas espontáneas de cebolla que aparecen en los cultivos que se plantan a continuación de este cultivo (GENT *et al.*, 2004), de ahí la importancia de la limpieza y destrucción de todos los restos del cultivo anterior. En el programa IPM del estado de Colorado también se incluyen como medidas de control, la rotación de cultivos y la selección de variedades de cebollas menos suscep-

tibles, llevar a cabo plantaciones con semillas y plantas de transplante sanas, la actuación sobre las plantas silvestres de la parcela y de los alrededores ya que se desconoce si pueden existir otras plantas hospedadoras del virus que puedan actuar de reservorios y el control de los trips (SCHWARTZ *et al.*, 2003).

Según GENT *et al.* (2004), estudios preliminares sugieren que el estrés de las plantas, como temperatura y humedad extremas, compactación del suelo y patógenos del suelo como raíz rosada, están asociados con la enfermedad. Por tanto, es recomendable mantener las plantas lo menos estresadas posible.

CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos concluimos que la nueva enfermedad de la cebolla es atribuible al Iris yellow spot virus (IYSV), Tospovirus transmisible por *Thrips tabaci*. Según nuestra información, es la primera cita de esta enfermedad en nuestro país. Las muestras analizadas corresponden a la detección de algunas plantas con síntomas, de momento no tenemos constancia de su extensión pero esta enfermedad debería tenerse en cuenta y adoptar las medidas necesarias dado el peligro potencial que supone por lo extendido y abundante que está el vector de la enfermedad en el cultivo de la cebolla.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio ha sido realizado en colaboración con el Grupo de Protección de Cultivos del ITAP (Diputación de Albacete) y el Grupo de Virología de la Universidad Politécnica de Valencia dentro del Convenio que tiene suscrito esta última con el M.A.P.A. como Laboratorio de Referencia de Virus, Viroides y Fitoplasmas.

ABSTRACT

CÓRDOBA SELLÉS C., L. MARTÍNEZ PRIEGO, R. M. MUÑOZ GÓMEZ, M. L. LERMA TOBARA, C. JORDÁ GUTIÉRREZ., 2005. Iris yellow spot virus (IYSV): A new virus disease in the spanish onions. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31: 425-430.

A new onion disease was detected recently, caused by a new Tospovirus, Iris Yellow Spot Virus (IYSV). Diseased plants show both ringspots and whitish spindle-shaped spots; plants also present early leaf senescence which begins in leave tops and older leaves; likewise, bulbs are reduced in size. The identification was carried out by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) of leaf sap extracted from symptomatic plants, using specific antisera against IYSV. The ELISA result was verified with a one step reverse transcription-polymerase chain reaction assay (RT-PCR) using primers specific to the nucleocapsid gene of IYSV. The identity of the PCR product with an expected size of approximately 790 bp. was confirmed by sequencing and comparison with the published IYSV sequence deposited in the Genbank database (AB121026), where 97% similarity was found.

Key words: Diagnosis, *Thrips tabaci*, *Allium cepa*, Tospovirus RT-PCR, serology.

REFERENCIAS

- CORTES, I., LIVIERATOS, I. C., DERKS, A., PETERS, D., y KORMELINK, R. 1998. Molecular and serological characterization of *Iris Yellow Spot Virus*, a new and distinct tospovirus species. *Phytopathology*, **88**: 1276-1282.
- COUTTS, B.A., MCMICHAEL, L.A., TESORIERO, L., RODONI, B.C., WILSON, C.R., WILSON, A.J., PERSLEY, D.M. y JONES, R.A.C. 2003. *Iris yellow spot virus* found infecting onions in three Australian states. *Australasian Plant Pathology*, **32**(4): 555-557.
- DERKS AFLM, LEMMERS MEC, 1996. Detection of tospoviruses in bulbous crops and transmissibility by vegetative propagation. *Acta Hort.* 432:132-137.
- GENT, D. H., SCHWARTZ, H. F., y 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.
- GERA, A., KRITZMAN, A., COHEN, J., BEKELMAN, E., MANOR, H., GANAIM, N., YUNIS, H. y RACCAH, B. 1997. Identification of a Tospovirus in Onion. The 19th Congress of the Israeli Phytopathological Society. 16-17 February 16-17, 1997, The Volcani Center, Bet Dagan, Israel.
- GERA, A., COHEN, J., SALOMON, R., y RACCAH, B. 1998. *Iris Yellow Spot tospovirus* detected in onion (*Allium cepa*) in Israel. *Plant Disease*, **82**:127.
- HALL J.M., MOHAN K. KNOTT E.A., MOYER J.W., 1993. Tospovirus associated with scape blight of onion (*Allium cepa*) seed crops in Idaho. *Plant Disease* **77**:952
- KRITZMAN, A., BEKELMAN, H., ALEXANDROV, S., LAMPEL, M., ZEIDAN, M., RACCAH, B. y GERA, A. 2000. Lisianthus leaf necrosis: a new disease of lisianthus caused by *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease*, **84**(11): 1185-1189.
- KRITZMAN, A., LAMPEL, M., RACCAH, B., Y GERA, A. 2001a. Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease*, **85**:838-842.
- KRITZMAN, A., RACCAH, B. y GERA, A. 2001b. Transmission of *Iris Yellow Spot Tospovirus*. Proceedings of the 7th International Symposium on *Thysanoptera*. 2-7 julio 2001, Regio Calabria, Italia.
- NAGATA, T., ALMEIDA, A.C.L., RESENDE, R. DE O. y DE ÁVILA, A.C. 1999. The identification of the vector species of *iris yellow spot tospovirus* occurring on onion in Brazil. *Plant Disease*, **83**: 399.
- POZZER, L., BEZERRA, I.C., KORMELINK, R., PRINS, M., PETERS, D., RESENDE, R. DE O. Y DE AVILA, A.C. 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.
- POZZER, L., NAGATA, T., LIMA, M.I., KITAJIMA, E.W., RESENDE, R. DE O. y AVILA, A.C. 1994. "Sapeca": An onion disease in the Sub-Médio S_o Francisco region, Brazil, is caused by a tospovirus with a serologically distinct nucleocapsid protein. *Fitopatol. Bras.*, **19**: 321.
- SHAHRAEEN, N., GHOTBI, T. 2003. Natural occurrence of different Tospovirus species infecting ornamentals and other agricultural crops in Iran (Abstract 23.26 of a paper presented at the 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand (2003-02-02/07).
- EPPO 2004. EPPO Alert List (on line). Disponible en http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/viruses/irysxx.htm
- OCKEY, S. C. y THOMSON, S.V. *Iris Yellow Spot Virus* (IYSV) Tospovirus. Exotic Pest Monitoring Series [on line]. Disponible en http://extension.usu.edu/plantpath/exoticpests/iris_yellow_spot_virus.pdf
- PELTER, G. 2001. A Newly Identified Onion Virus. Agrifocus [on line]. Disponible en http://grant-adams.wsu.edu/agriculture/agrifocus_newsletters/Sep2001.htm
- SCHWARTZ, H., BROWN, W., BLUNT, T. y GENT, D. New onion disease in Colorado. 2003. *Iris Yellow Spot Virus* (tospovirus) [on line]. Disponible en <http://www.coopext.colostate.edu/TRA/PLANTS/index.html#http://www.colostate.edu/Depts/CoopExt/TRA/PLANTS/irysv.html>

(Recepción: 3 marzo 2005)

(Aceptación: 6 julio 2005)