

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**“DETECCIÓN E INCIDENCIA DEL FITOPLASMA *Maize
Bushy Stunt* Y SU RELACIÓN CON EL RENDIMIENTO EN
MAÍZ EN EL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO”**

SUSANA ALCÁNTARA MENDOZA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO.

2009

La presente tesis titulada: **Detección e incidencia del fitoplasma *Maize Bushy Stunt* y su relación con el rendimiento en maíz en el Estado de Veracruz, México**, fue financiada por el proyecto SAGARPA-CONACYT 2005-12365 y realizada por la alumna: **Susana Alcántara Mendoza**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPALOTOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR:

Consejero:

Dr. Daniel Téliz Ortiz

Asesor:

Dr. Carlos de León García de Alba

Asesor:

M. C. Dimas Mejía Sánchez

Asesor:

Dra. Ana María Hernández Anguiano

Asesor:

Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio 2009

**DETECCIÓN E INCIDENCIA DEL FITOPLASMA *Maize Bushy Stunt* Y SU
RELACIÓN CON EL RENDIMIENTO EN MAÍZ EN EL ESTADO DE VERACRUZ,
MÉXICO**

Alcántara Mendoza Susana, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2009

Una nueva enfermedad del maíz apareció en el estado de Veracruz, México durante 2003-2004. Síntomas de amarillamiento, enrojecimiento y posterior quemado de hojas, proliferación de mazorcas, jilotes raquíuticos, falta de fecundación y granos vanos fueron parte del síndrome de la enfermedad. El fitoplasma *Maize Bushy Stunt* (MBS) se identificó por PCR se detectó en plantas con los síntomas antes descritos, en los municipios de Tlalixcoyan, Cosoleacaque y Paso de Ovejas en 2006 y 2007. Los genotipos CP-562, 30F83, 30F92, Orca, 30F96, Nutria y Asgrow 7573 resultaron positivos a la presencia del MBS, mientras que en 3086, 30F97 y CP-560 no se detectó la presencia del MBS en una plantación experimental en plantas sintomáticas en Tlalixcoyan, Ver. en 2006 y 2007. La mayor incidencia se presentó en los genotipos 30F83 (27%), AS7573 (21%) y 30F97 (21%) con una severidad de 0.29, 0.14 y 0.15 respectivamente. Los genotipos con mayor rendimiento en peso de semilla fueron ORCA (4714 kg ha⁻¹), AS-7573 (5445 kg ha⁻¹), y 39F97 (4062 kg ha⁻¹). Hubo correlación positiva de la incidencia con la severidad de la enfermedad ($r=0.69$), la incidencia con el número de mazorcas enfermas ($r=0.43$) y de la severidad con la disminución en peso de semilla sana ($r=0.51$). La identificación del MBS se confirmó mediante secuenciación directa. La secuencia fue depositada en el Genbank y mostró una homología de 99% con el genoma del MBS. Otros síntomas como pudrición vascular en tallo, franjeado foliar, necrosis en la vaina de la hoja, manchas blancas en las brácteas, necrosis de la nervadura central y deformación del jilote también fueron observados como parte del síndrome de la enfermedad y se encontraron asociados a bacterias, cuyos resultados se reportarán por separado.

Palabras clave: *Maize Bushy Stunt*, PCR, incidencia, resistencia genética, genoma y homología.

DETECTION AND INCIDENCE OF *Maize Bushy Stunt* FITOPLASMA AND ITS RELATION WITH MAIZE YIELD IN THE STATE OF VERACRUZ, MEXICO

Alcántara Mendoza Susana, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2009

A new disease of maize appeared in Veracruz, Mexico during 2003-2004. Yellowing, reddening and leaf necrosis, proliferation and poor growth of corncobs, lack of pollination and vain grain were part of the syndrome of the disease. The *Maize Bushy Stunt* (MBS) phytoplasma identified by PCR was detected in plants with these symptoms from Tlalixcoyan, Cosoleacaque and Paso de Ovejas countries in 2006 and 2007. MBS phytoplasma was detected in the maize genotypes CP-562, 30F83, 30F92, Orca, 30F96, Nutria and Asgrow 7573, whereas it was negative in 3086, 30F97, and CP-560 in an experimental plot in Tlalixcoyan, Veracruz, México in 2006 and 2007. The greatest incidence appeared in the genotypes 30F83 (27 %), AS7573 (21 %) and 30F97 (21 %) with a severity of 0.29, 0.14 and 0.15 respectively. Highest yield of seed was obtained in genotypes. ORCA (4714 kg ha⁻¹), AS-7573 (5445 kg ha⁻¹) and 39F97 (4062 kg ha⁻¹). Positive correlation was obtained between incidence and severity of the disease (r=0.69), incidence and number of symptomatic ears (r=0.43) and severity with decrease in weight of healthy seed (r=0.51). The identification of the MBS was confirmed by direct sequence. The sequence was deposited in the Genbank and proved to have a 99 % similarity with MBS genome. Other symptoms like stem rot, leaf stripes, leaf pod necrosis, white spots on the bracts, necrosis of the central vein and deformation of corncobs were also observed as part of the disease syndrome, but associated with bacteria, whose results will be published separately.

Key words: *Maize Bushy Stunt*, PCR, incidence, genetic resistance, genome and homology.

DEDICATORIA

A:

SRA. MARÍA NATIVIDAD MENDOZA CARMONA

Gracias mami por apoyarme siempre, te quiero

DOMINGO COLMENARES ARAGON:

Esta tesis es la mitad tuya, sin ti no lo hubiera logrado, con amor.

MI HERMANO HENOCK:

Para que nunca dejemos de soñar

MIS ABUELOS:

JUAN MENDOZA Y FRANCISCA CRUZ

Por enseñarme el valor de la vida

Y LA FAMILIA MENDOZA CRUZ:

Porque apoyarme con su sola presencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento para mis estudios de Maestría y al proyecto SAGARPA-CONACYT 2005-12365, por el financiamiento parcial en el proyecto de investigación de tesis.

Al Colegio de Postgraduados y al área de fitopatología por la oportunidad de formarme.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz por la valiosa conducción de este trabajo, pero sobre todo por su gran tolerancia, paciencia y apoyo moral para lograr finalizar esta investigación.

Al M.C. Dimas Mejía Sánchez, por confiar en este trabajo de investigación, por los recursos materiales brindados y por sus conocimientos compartidos

Al Dr. Rodolfo de la Torre, Dr. Carlos de León, Dra. Ana María Hernández y a la Dra. Elizabeth Cárdenas por sus valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo y que permitieron darle relevancia a los datos obtenidos en esta investigación.

Al Dr. Gustavo López del Colegio de Postgraduados, campus Veracruz, por su apoyo en los experimentos de campo.

Al Dr. Antonio Marin Jarillo de INIFAP Guanajuato, por su ayuda en la identificación taxonómica de *Dalbulus maidis*.

A mis profesores, compañeros de laboratorio y amigos que hicieron agradable mi estancia en el Colegio de Postgraduados

CONTENIDO

RESUMEN	ii
SUMARY	iii
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1 Colecta de material vegetal	6
2.2 Detección de virus	7
2.3 Microscopia de fluorescencia y DAPI	8
2.4 Detección de fitoplasmas por PCR	8
2.4.1 Extracción de ácidos nucleicos	8
2.4.2 Condiciones de detección de fitoplasmas	9
2.4.3 Iniciadores universales para fitoplasmas	9
2.4.4 Amplificación anidada	10
2.4.5 Iniciadores específicos	10
2.4.6 Secuenciación de nucleótidos	11
2.5 Incidencia, severidad y distribución de la enfermedad	11
2.5.1 Incidencia	11
2.5.2 Severidad	12
2.5.3 Distribución	12
2.6 Incidencia y rendimiento	13
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
3.1 Detección de virus	15
3.2 Microscopia de fluorescencia y DAPI	16
3.3 Detección de fitoplasmas por PCR	17
3.3.1 Iniciadores universales y amplificación anidada	17
3.3.2 Iniciadores específicos	18
3.3.3 Secuenciación de nucleótidos	21

3.4 Incidencia, severidad y distribución de la enfermedad	22
3.5 Incidencia y rendimiento	27
IV. CONCLUSIONES	32
V. LITERATURA CITADA	33

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PAG
1 Síntomas asociados al fitoplasma <i>Maize Bushy Stunt</i> observados en plantas de maíz Asgrow 7573 durante el ciclo 2006-07 en tres municipios de Veracruz.	6
2 Evaluación de 52 genotipos de maíz con síntomas del achaparramiento del maíz en el Campus Veracruz del Colegio de Postgraduados en el municipio de Manlio Fabio, Ver. 2005.	14
3 Ubicación de las parcelas muestreadas en los municipios de Cosoleacaque, Tlalixcoyan y Paso de Ovejas, Veracruz, para la detección de fitoplasmas asociados con el achaparramiento del maíz en 2006 y 2007.	22
4 Comparación de medias de las variables evaluadas en 10 genotipos de maíz expuestos naturalmente a la infección del <i>Maize Bushy Stunt</i> en Tlalixcoyan, Ver. Ciclo primavera-verano 2007	28
5 Correlación de las variables evaluadas en 10 genotipos de maíz expuestos naturalmente a la infección del fitoplasma MBS en Tlalixcoyan, Ver. Ciclo primavera-verano 2007.	30

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAG.
1	A) Amarillamiento foliar, B) achaparramiento de la planta, enrojecimiento y rayado foliar. C) hojas secas y D) proliferación de mazorcas, síntomas asociados al fitoplasma Maize Bushy Stunt en Veracruz, México, 2007.	2
2	E) Jilote raquítico, F) mazorca de maíz con granos vanos y falta de fecundación G) pudrición vascular del tallo de maíz H) franjeado foliar de maíz, síntomas asociados al fitoplasma Maize Bushy Stunt en Veracruz, México, 2007.	3
3	I) Necrosis en la vaina de la hoja de maíz, J) manchas blancas en las brácteas del elote de maíz, K) necrosis de la nervadura central y L) deformación del jilote de maíz, síntomas asociados al fitoplasma Maize Bushy Stunt en Veracruz, México, 2007.	4
4	Plantas de maíz en Tlalixcoyan, Ver. con síntomas de A) Proliferación de mazorcas con hojas en las brácteas. B) Hojas arrossetadas con inflorescencia verde.	7
5	Corte longitudinal de hojas de plantas de maíz enfermas teñido con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol-2HCl), en el que se observa fluorescencia de fitoplasmas. Imagen con incrementó a 40X.	16
6	Amplificación anidada de la secuencia 16S DNAr de fitoplasmas con el par de iniciadores universales P1/P7 y R16R2/R16F2. Carril 1y 7: Marcador 100 pb Invitrogen, Carril 2: Control negativo de agua libre de DNAsas y RNAsas, Carril 3: muestra positiva de maíz de Paso de Ovejas (1PSO), Carril 4: muestra positiva de maíz de Cosoleacaque (1COS), Carril 5: muestra positiva de maíz de Tlalixcoyan (1TLA), Carril 6: Control positivo de muestra infectada con el fitoplasma MBS (+) (University of California, Davis), Carril 7: Marcador 100 pb Invitrogen.	18

7	Amplificación de la secuencia 16S DNAr de fitoplasmas con el par de iniciadores específicos MBSR1/MBSF1. Carril 1: marcador Invitrogen de 100 pb, carril 2: muestra negativa de agua, carril 3-12: muestras positivas de Cosoleacaque, Tlaxicoyan y Paso de Ovejas, carril 13: muestra testigo positiva de maíz infectada con el fitoplasma MBS (+) (University of California, Davis).Carril 14: marcador Invitrogen de 100 pb.	19
8	Detección del fitoplasma Maize Bushy Stunt en 10 genotipos de maíz en Veracruz. Carriles 1 y 14: marcador molecular Invitrogen de 100 pb, Carril 2: negativo con agua, Carril 3: CP-562, Carril 4: 3086, Carril 5: 30F83, Carril 6: 30F92, Carril 7: Orca, Carril 8: 30F97, Carril 9: 30F96, Carril 10: CP-560, Carril 11: Nutria, Carril 12: Asgrow 7573 y Carril 13: Control positivo al MBS.	20
9	Distribución de la incidencia (A) y severidad (B) de la enfermedad por el fitoplasma Maize Bushy Stunt en la var. Asgrow 7573 en el ciclo primavera-Verano 2007 (Abril-Agosto), en Tlaxicoyan, Veracruz.	24
10	Distribución espacial de la incidencia del achaparramiento del Maize Bushy Stunt en el cultivo de maíz, A) invierno 2006 (Nov 2006-Feb 2007) y B) primavera-verano 2007 (Abr-Ago 2007) en Tlaxicoyan, Ver	25
11	Distribución espacial de la incidencia del achaparramiento del Maize Bushy Stunt en el cultivo de maíz. A) otoño-inverno 2006 (Ago-Dic) y B) primavera-verano 2007 (Mar-Ago) en Cosoleacaque, Ver	25
12	Genotipos evaluados en su comportamiento a una infección natural del fitoplasma MBS. RTO=Rendimiento en peso de mazorca, MAZENF=mazorcas enfermas, DISMREND=Disminución del rendimiento, INCID=Incidencia del fitoplasma MBS, SEVER= Severidad de la enfermedad del MBS.	29

I. INTRODUCCIÓN

En 2003 se presentó una enfermedad de etiología desconocida en plantaciones de maíz Asgrow 7573 en los municipios de Tlaxiaco, Cosoleacaque, Piedras Negras y Paso de Ovejas, Veracruz. La enfermedad se caracterizó por síntomas de amarillamiento, enrojecimiento (puede o no presentarse) y posterior quemado de hojas (tizón foliar), secado de la planta, proliferación de mazorcas, jilotes raquíuticos, falta de fecundación y granos vanos, pudrición vascular en el tallo, franjeado foliar, necrosis en la vaina de la hoja y manchas blancas en la bráctea, necrosis en la nervadura central y deformación del jilote (Figura 1, 2 y 3). El síntoma de amarillamiento comenzó en el margen de las hojas inferiores, avanzó hacia las hojas superiores y se expandió al resto del follaje; posteriormente las hojas se tornaron de rojo a púrpura. Las plantas presentaron altura reducida y proliferación de mazorcas con deficiente o nula fecundación. Los granos de la mazorca fueron pequeños y con deficiente desarrollo. Las hojas se secaron de la punta a la base y la planta de maíz de la base hacia el ápice.

Los síntomas iniciaron en la etapa de floración y terminaron con el secamiento total y muerte de la planta en la etapa del llenado de grano. Las mazorcas pequeñas y con granos vanos no fueron comerciables.

Los síntomas encontrados en la presente investigación fueron atribuidos a diferentes patógenos. Gijón *et al.*, 2008 identificaron a la bacteria *Burkholderia gladioli* en plantas con síntomas de manchas pequeñas, amarillo blanco que se unieron para formar franjas secas necróticas sobre las hojas, putrefacción y necrosis de la base de hoja bandera, enrollamiento hacia el haz y desecación, presencia ocasional de enrojecimiento y putrefacción en la corona de los tallos y en la base de los granos, y achaparramiento de la planta.



Figura 1. A) amarillamiento foliar. B) achaparramiento de la planta, enrojecimiento y rayado foliar. C) hojas secas y D) proliferación de mazorcas, síntomas asociados al fitoplasma *Maize Bushy Stunt* en Veracruz, México, 2007.

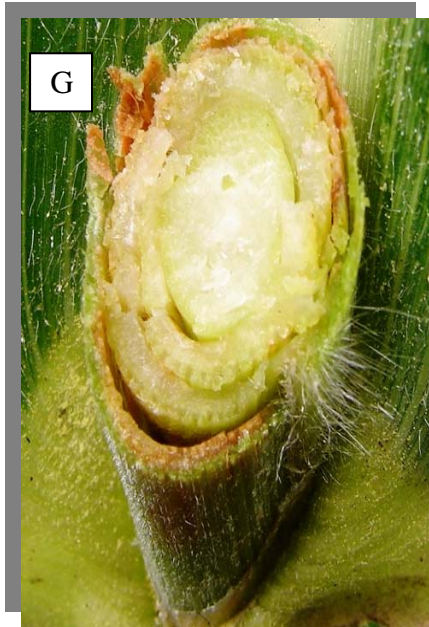


Figura 2. E) jilote raquitico, F) mazorca de maíz con granos vanos y falta de fecundación G) pudrición vascular del tallo de maíz H) franjeado foliar de maíz, síntomas asociados al fitoplasma *Maize Bushy Stunt* en Veracruz, México, 2007.



Figura 3. I) Necrosis en la vaina de la hoja de maíz, J) manchas blancas en las brácteas del elote de maíz, K) necrosis de la nervadura central y L) deformación del jilote de maíz, síntomas asociados al fitoplasma *Maize Bushy Stunt* en Veracruz, México, 2007.

Síntomas de manchas foliares irregulares, verde oscuro de aspecto húmedo, y con un halo amarillento fueron atribuidos a *Pantoea ananatis*. En síntomas avanzados las manchas adquirieron un color blanco grisáceo y la hoja se tornó rojiza (Gijón, datos por publicar.). Las lesiones avanzadas terminan en la muerte del tejido.

El síntoma de rayado foliar fue atribuido a la presencia de la bacteria *Acidovorax avenae* subs. *avenae*. Los síntomas del rayado foliar fueron hojas con manchas acuosas, de forma irregular, limitadas por las nervaduras, que al unirse en estados avanzados de la enfermedad, se extendieron a lo largo de la hoja formando un rayado de color pajizo a blanco. El tejido frecuentemente presentó desgarramiento. Las hojas enfermas que envolvieron a la espiga le ocasionaron pudrición (Gijón, datos por publicar.).

Por la semejanza de algunos de los síntomas de la enfermedad en estudio con los del fitoplasma *Maize Bushy Stunt* (MBS por sus siglas en inglés), la presente investigación se concentró en dilucidar la posible participación del MBS como agente involucrado en esta enfermedad del maíz en Veracruz, mediante la detección de su presencia, incidencia y asociación con el rendimiento del cultivo.

Los síntomas de enrojecimiento foliar y proliferación de mazorcas son similares a los que causa el fitoplasma MBS (Nault, 1980 y CIMMYT, 2004). Los síntomas causados por el MBS incluyen clorosis en los márgenes de las hojas, enrojecimiento en las puntas de las hojas más viejas, presencia de numerosos brotes axilares y basales, formación de mazorcas estériles, mazorcas con diámetro y tamaño de grano reducido y plantas con sistema radical reducido (CIMMYT, 2004, Nault, 1998). *Spiroplasma kunkelli* también causa enrojecimiento foliar en maíz pero no tan extenso como el producido por el fitoplasma MBS. *S. kunkelli* causa pequeñas manchas cloróticas en la base de las hojas jóvenes hasta formar rayas que se amplían hasta las puntas y pueden afectar hojas enteras. A bajas temperaturas, la base de las hojas superiores muestran amarillamiento y enrojecimiento (Nault, 1980).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Colecta de material vegetal

Muestras de plantas enfermas se colectaron en los municipios de Cosoleacaque, Tlaxicoyan y Paso de Ovejas, Veracruz, con base en los síntomas descritos por los agricultores de cada región. De 14 parcelas se tomaron 30 muestras de plantas con síntomas de enrojecimiento en el margen de las hojas, amarillamiento y franjeado en hojas jóvenes del estrato medio y completamente desarrolladas, pudrición y proliferación de mazorcas (Cuadro 1). Las inflorescencias verdes y hojas delgadas en posición verticilar arrosetada parecen ser síntomas no registrados previamente, por lo que se colectaron para detectar la presencia de fitoplasmas (Figura 4).

Los muestreos se efectuaron en el ciclo primavera-verano 2006 en Paso de Ovejas, ciclo invierno 2006-primavera 2007 en Tlaxicoyan y ciclo otoño-inverno 2006 en Cosoleacaque. El número de muestras colectadas en cada parcela varió de 1 a 30, dependiendo de la frecuencia de plantas con síntomas. Cada muestra consistió de hojas y raíces adventicias de plantas enfermas. El total de muestras colectadas fue de 120.

Cuadro 1. Síntomas asociados al fitoplasma *Maize Bushy Stunt* observados en plantas de maíz Asgrow 7573 durante el ciclo 2006-07 en tres municipios de Veracruz.

Municipio	Síntomas
Cosoleacaque	Amarillamiento y enrojecimiento foliar, acortamiento de entrenudos, tallo delgado y con o sin proliferación de mazorcas
Paso de ovejas	Amarillamiento y enrojecimiento en el margen de las hojas y con dos a tres mazorcas distribuidas uniformemente en la planta
Tlaxicoyan	Tallo delgado con amarillamiento foliar, enrojecimiento en el borde de las hojas, proliferación de mazorcas en la misma yema reproductiva. Hojas en las brácteas (Figura 4A). Brácteas en forma de hojas en posición arrosetada, abiertas con una inflorescencia verde (Figura 4B)

Las muestras de maíz colectadas en las tres zonas de muestreo pertenecían al genotipo Asgrow 7573.



Figura 4. Plantas de maíz en Tlaxicoyan, Ver. con síntomas de A) Proliferación de mazorcas con hojas en las brácteas. B) Hojas arrosetadas con inflorescencia verde.

2.2 Detección de virus

Cincuenta muestras con síntomas se sometieron a la técnica serológica de inmunoabsorción enzimática ELISA (Crowther, 2001), para la detección del virus moteado clorótico del maíz (MDMV) y del virus del enanismo clorótico del maíz (MCDV), con el antisuero y el protocolo de AGDIA®. Cada placa de ELISA incluyó muestras duplicadas con un testigo negativo (planta sana), un testigo positivo (AGDIA®) y un testigo con buffer de extracción. La lectura de las placas se realizaron en un lector marca Dynatech® MR700, con filtro de 405 nm y se analizaron en función de la absorbancia. Se consideró positiva toda muestra cuyo valor promedio de absorbancia de las repeticiones resultó superior al triple de los valores promedio de la absorbancia de los testigos negativos, debido a que este valor representa un rango de error de 1% de falsos negativos y un 7% de falsos positivos, de acuerdo con Sutula *et al.*, (1986) en su análisis para la interpretación de resultados de en la técnica ELISA.

2.3 Microscopia de fluorescencia y DAPI

Hojas con síntomas de la enfermedad se lavaron con agua y detergente y se enjuagaron con agua destilada; posteriormente se trataron con hipoclorito de sodio al 4% y se enjuagaron con agua destilada. Las hojas fueron cortadas en fragmentos de 0.5 cm² y se fijaron en glutaraldehído al 5% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.0, por 3 horas. El tejido fijado se seccionó en cortes longitudinales de 25 µm de grosor con un micrótopo de congelación (A.O. Instrument Co.) y se procesaron por el método de Seemüller (1976). Los cortes se colocaron sobre un portaobjeto y se tiñeron con azul de anilina; después de 15 minutos se decantó el colorante, se agregó el DAPI (4, 6-diamino-2-fenilindol-2HCl) 1 mg/mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.0) y a los 20 minutos se observaron en un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, modelo Axiolab) con lámpara de mercurio HBO de 50 W y a longitud de onda de 365 nm a 40 y 100 X. La presencia de ácido nucleico diferente al de la planta se evaluó indirectamente por la intensidad de la fluorescencia observada en el floema.

2.4 Detección de fitoplasmas por PCR

2.4.1 Extracción de ácidos nucleicos

Hojas y raíces adventicias se usaron para extraer DNA total por el método Plant DNA-Zol®. Las raíces adventicias se lavaron con agua corriente para eliminar los residuos de suelo y se enjuagaron con agua destilada. El tejido vegetal de las muestras de raíz y hoja se colocó en un mortero estéril y se congeló a -70°C por 5 horas. El tejido congelado se trituró con un pistilo congelado y se transfirió 0.1 g de la muestra compuesta a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se adicionó 300 µl del reactivo Plant DNA-Zol®. La suspensión se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación. La suspensión se mezcló con 300 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente por 20 segundos. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos en agitación y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5 µl y se adicionó 250 µl de etanol absoluto frío (-8°C). Se mezcló por inversión de 6 a 8 veces y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 6500 rpm por 7 minutos y se tiró el sobrenadante. La pastilla

se lavó adicionando 300 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 6500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril libre de DNAasas y RNAasas (Gibco).

La calidad del DNA se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El DNA obtenido fue almacenado a 4°C.

2.4.2 Condiciones de detección de fitoplasmas

La detección de fitoplasmas se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Los iniciadores universales se utilizaron para detectar la presencia de fitoplasmas en el DNA total y en las muestras que resultaron positivas se usaron iniciadores específicos para detectar la presencia del fitoplasma MBS.

2.4.3 Iniciadores universales para fitoplasmas

La PCR inició con el par de iniciadores universales P1 (5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT-3') (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (5'- CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3') (Smart *et al.*, 1996), derivados del RNA ribosomal (RNAr) 16S y dirigidos a la región del gene DNAr 16S y parte de la región espaciadora intergénica, ubicada entre los genes ribosomales DNAr 16S y 23S y que amplifican un producto de 1800 pares de bases (pb).

La mezcla final de reacción de PCR consistió en 2.5 mM MgCl₂ (5 µL), buffer de reacción de PCR 1X (5 µL), 200 mM de mezcla de dNTP's (1 µL), 0.2 mM por cada iniciador (2 µL), 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa (1 µL), 2 µL de DNA (20-200 ng/µL) y agua destilada estéril libre de DNAasas y RNAsas Gibco® (32.5 µL) para un volumen final de 50 µL. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador automático, (Gene Amp. 24000, Perkin Elmer). El programa de termociclaje se realizó de acuerdo a lo reportado por Cervantes *et al.*, (2004): desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos un ciclo, desnaturalización a 94° C por 2 minutos, alineamiento: 55°C por

1 minuto, extensión a 72°C por 3 minutos por 35 ciclos y un solo ciclo para la extensión final a 72°C por 7 minutos.

2.4.4 Amplificación anidada

El producto que se obtuvo de la amplificación con los iniciadores P1/P7 fue sometido a reamplificación con los iniciadores universales R16F2n (5'-GAA ACG ACT AAG ACT GG-3') y R16R2F (5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA CCC G-3'), que amplifican un fragmento de 1200 pb de longitud (Lee *et al.*, 1993) bajo las mismas condiciones en que se realizó la primera amplificación.

Los productos de PCR (10 µl) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Los segmentos de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio Imagin System Mini Bis Pro) y se fotodocumentaron.

2.4.5 Iniciadores específicos

Los iniciadores específicos que se usaron para la amplificación del DNA del MBS fueron MBSF1 (5'-AA TGT CGA ACT AAC AGG CGG-3') y MBSR1 (3'-GGT TTT GGT TTA GCG GTT-5') (Barros *et al.*, 2001) que consisten en una secuencia parcial de un fragmento clonado de DNA genómico del fitoplasma MBS para obtener un producto del DNA sintético con 740 pb.

La mezcla final de reacción de PCR (50 µL volumen total) consistió en 2.5 mM MgCl₂ (5 µL), buffer de reacción de PCR 1X (5 µL), 200 mM de mezcla de dNTP's (1 µL), 0.2 mM por cada iniciador (2 µL), 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa (0.5 µL), 2 µL de DNA (20-200 ng/µL) y agua destilada estéril libre de DNAasas y RNAsas Gibco® (31.5 µL). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador automático (Bio Rad®) con las condiciones de temperatura reportadas por Harrison *et al.*, (1996): temperatura de desnaturalización inicial a 94°C por 1 min y 35 ciclos de temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 minuto, anillamiento a 57°C por 2 min y extensión a 72°C por 3 min (7 min en el ciclo final). Los productos de PCR (10 µl) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se fotodocumentaron.

El testigo positivo que se usó en la reacción de PCR con iniciadores universales y específicos consistió de una muestra de DNA del fitoplasma MBS, donada por el Dr. Robert Davis de la Universidad of California, Davis. El testigo negativo fue agua destilada estéril libre de RNAsas y DNAsas.

2.4.6 Secuenciación de nucleótidos

Los productos de PCR se purificaron con el reactivo de Wizard® SV (Promega Corporation, USA). Los fragmentos se secuenciaron en el Instituto de Fisiología celular de la Universidad Autónoma de México, en un secuenciador automático de DNA (Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystem Corp). Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando el método BLAST (NCBI, 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, consulta abril 2008).

2.5 Incidencia, severidad y distribución de la enfermedad

2.5.1 Incidencia

Trece parcelas de maíz en etapa de espiga con síntomas de amarillamiento y enrojecimiento foliar, proliferación de mazorcas y reducción de entrenudos se localizaron para evaluar la incidencia de los síntomas en los municipios de Tlalixcoyan, Cosoleacaque y Paso de Ovejas, Ver. (Cuadro 3). En cada parcela se seleccionaron 10 puntos en forma de zigzag y en cada punto se eligió un surco al azar. De diez plantas continuas por surco se contó el número de plantas con síntomas de la enfermedad y se calculó el porcentaje de incidencia. El porcentaje de incidencia en la parcela se obtuvo promediando el porcentaje de incidencia en cada punto. De cada planta con síntomas se muestrearon hoja y raíces adventicias para la detección molecular del patógeno. Las parcelas con plantas sintomáticas de achaparramiento se georeferenciaron con el sistema de posicionamiento global (GPS38 personal navigator), con el fin de localizar la ubicación de la enfermedad en la región.

2.5.2 Severidad

La severidad de la enfermedad se midió utilizando una escala visual arbitraria de los síntomas. La escala se generó mediante un recorrido a las parcelas afectadas y en base a los síntomas encontrados, se seleccionaron diferentes clases de síntomas: Clase 0: Planta sana, Clase 1: Planta de altura normal con hojas de bordes enrojecidos, Clase 2: Planta chaparra con hojas de bordes enrojecidos, Clase 3: Plantas de altura normal con proliferación de mazorca, Clase 4: Planta chaparra con proliferación de mazorca, Clase 5: Plantas de altura normal con hojas de bordes enrojecidos y proliferación de mazorca y Clase 6: Planta chaparra con hojas de bordes enrojecidos y proliferación de mazorca. El enrojecimiento de la hoja se consideró desde un ligero enrojecimiento acompañado de clorosis marginal, hasta un enrojecimiento marcado en el borde o en la totalidad de la hoja.

En una parcela de maíz del genotipo Asgrow 7573, establecida en el municipio de Tlalixcoyan, a $18^{\circ} 42.892'$ latitud norte y $96^{\circ} 07.401'$ longitud oeste se validó la escala diseñada y se diagnosticó la severidad de la enfermedad durante el ciclo de cultivo primavera-verano 2007. En el centro de la parcela se eligieron 26 surcos continuos y 26 plantas por surco y se contó la severidad de cada planta y la posición de la planta en el surco. El mapa de distribución y severidad de la enfermedad dentro de la parcela se elaboró con el programa Surfer. La severidad de cada planta se representó con la escala establecida.

2.5.3 Distribución

La distribución de la enfermedad dentro de la parcela se determinó con un muestreo dirigido. En el centro de la parcela se eligieron 26 surcos continuos y 26 plantas por surco. En cada surco se determinó la localización de cada planta sintomática mediante el registro del número de surco y el número de planta enferma y el mapa de distribución de la enfermedad se elaboró con el programa Surfer.

2.6 Incidencia y rendimiento

La incidencia del síndrome de la enfermedad se estudió en 52 genotipos de maíz en una parcela experimental en el Campus Veracruz del Colegio de Postgraduados en el municipio de Manlio Fabio, Ver. en 2005 (Cuadro 2), ubicada a los 19°09' de latitud Norte y 96°20' de longitud oeste a 44 msnm. El clima en la región es Awo (w) (i)gw'', tropical lluvioso regular con temperatura promedio de 25°C y precipitación pluvial media anual de 909 mm (García, 1987).

De los 52 genotipos se seleccionaron siete ordenados de mayor a menor incidencia; 30F83, 30F92, 30F96 y 30F97 de la empresa comercial Pioneer, CP-560 del Colegio de Posgraduados y Nutria y Orca de la empresa Monsanto. Se incluyeron los genotipos 3086 de Pioneer a sugerencia de la empresa, CP-562 por su alto rendimiento y por ser comercializada en la zona de Manlio Fabio y Paso de ovejas, y Asgrow 7573 en el cuál se encontró la enfermedad. Los genotipos seleccionados se sometieron a un estudio de incidencia de síntomas de amarillamiento y enrojecimiento foliar, reducción de entrenudos y proliferación de mazorcas en 2007, en una parcela experimental que se plantó en la localidad de Moralillo, municipio de Tlalixcoyan ubicada 18° 42.892' latitud norte y 96° 07.401' longitud oeste, con un clima en la región Aw2 (w) (i')gw'' que corresponde a un clima cálido subhúmedo (el más húmedo de los subhúmedos) con lluvias en verano, con cociente de precipitación mayor a 55.3 mm, con temperatura media anual de 26°C y con precipitación pluvial media anual de 1,532 mm.

La siembra de maíz se realizó en dos ciclos invierno 2006-2007, (Noviembre a Marzo) y primavera 2007 (Abril a Agosto). El diseño experimental fue en bloques al azar con cuatro repeticiones en surcos de 5 metros de largo y 0.8 metros entre surcos, con una densidad de población de 5 plantas por metro cuadrado. Cada repetición consistió de 8 metros cuadrados. A los 72 días después de la siembra se colectaron muestras compuestas por genotipo con plantas que mostraban síntomas de enrojecimiento foliar y clorosis marginal.

Cuadro 2. Evaluación de 52 genotipos de maíz asociados a síntomas del achaparramiento del maíz en el Campus Veracruz del Colegio de Postgraduados en el municipio de Manlio Fabio, Ver. 2005.

Genotipo	Incidencia (%)	Genotipo	Incidencia (%)
1.-Naya 39	35.484 ^a	27.-Chiapas 223	9.678 abcde
2.-Tamaulipas 8	33.871 ab	28.-Trin GP 1	9.678 abcde
3.-Oaxaca 54	32.258 abc	29.-Oaxaca 57	8.065 abcde
4.-Chiapas 236	30.654 abcd	30.-Morelos 3	8.065 abcde
5.-Oaxaca 52	29.033 abcde	31.-Guerrero 8	6.452 abcde
6.-Coahuila 40	29.032 abcde	32.-Michoacán 200	6.452 abcde
7.-Sinaloa 6	25.807 abcde	33.-México 210	6.452 abcde
8.-Jalisco 263	24.194 abcde	34.-San Luis Potosí 78	6.452 abcde
9.-Chiapas 110	24.194 abcde	35.-VS536	6.542 abcde
10.-Guerrero 153	22.581 abcde	36.-Cuba 124	6.452 abcde
11.-Oaxaca 48	22.581 abcde	37.-Perú 5	4.839 bcde
12.-Oaxaca 50	20.968 abcde	38.-Cuba 94	4.839 bcde
13.-Chiapas 196	20.968 abcde	39.-Taba 1	4.839 bcde
14.-Chihuahua 15	20.968 abcde	40.-30F97	3.226 cde
15.-Oaxaca 70	19.357 abcde	41.-SLP 105	3.226 cde
16.-Jalisco 99	19.355 abcde	42.-30F96	3.226 cde
17.-Coah 7	19,355 abcde	43.-30F83	1.613 de
18.-Guerrero 9	16.129 abcde	44.-Ver 225	1.613 de
19.-Jalisco 262	16.129 abcde	45.-Jalisco 281	1.613 de
20.-Chiapas 113	14.516 abcde	46.-Orca	1.613 de
21.-Oaxaca 11	12.904 abcde	47.-Hidalgo 34	1.613 de
22.-Morelos 15	12.904 abcde	48.-Nutria	0 e
23.-Puebla 196	12.903 abcde	49.-H520	0 e
24.-Oaxaca 51	12.903 abcde	50.-30F92	0 e
25.-Oaxaca 179	11.291 abcde	51.-30F94	0 e
26.-Puebla 200	11.290 abcde	52.-CP560	0 e

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales, Tuckey ($\alpha \leq 0.05$)

Las variables evaluadas fueron: Rendimiento (RTO)= Peso total en mazorca por hectárea, número de mazorcas totales por hectárea (MAZTOT), número de mazorcas con apariencia enferma (MAZENF), número de mazorcas enfermas (podridas, sin desarrollar o con presencia de granos vanos) con respecto al total de mazorcas expresado en porcentaje (DISMAZ), rendimiento por hectárea en peso de semilla (PSEM), peso en semilla de mazorcas enfermas por hectárea (PESENF), peso en semilla de mazorcas con apariencia sana menos peso de semilla de mazorcas con apariencia enferma (DIFPES), disminución del rendimiento en semilla (Peso en semilla enferma con respecto al peso de semilla sana expresado en porcentaje, número de plantas enfermas con respecto al total de plantas por hectárea (INC), severidad (SEVER) suma del grado de severidad (de 0 a 6 de acuerdo a la escala propuesta) de cada planta con síntomas dividido entre el número de plantas enfermas, aspecto de la planta en escala de 5 a 1 (ASPEC), donde 5 fue aspecto sano, 4 aspecto medianamente sano, 3 aspecto medianamente enfermo, 2 aspecto con más del 75% enfermo y 1 aspecto totalmente enfermo. La incidencia de la enfermedad se evaluó en etapa de floración en el ciclo invierno 2006-2007, y en etapa de llenado de grano en el ciclo primavera 2007 (Abril a Agosto).

Los datos de incidencia se analizaron usando los procedimientos GLM y CORR (Statistical Analysis System SAS, 1999). La comparación de medias entre variables evaluadas se efectuó mediante la prueba de Tukey con un $\alpha \leq 0.01$.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Detección de virus

Muestras de plantas sintomáticas del genotipo Asgrow 7573 que se colectaron en los tres municipios y de los genotipos de maíz establecidos en el lote experimental resultaron negativas por ELISA a la presencia del virus moteado clorótico del maíz (MDMV) y al virus del enanismo clorótico del maíz (MCDV).

3.2 Microscopia de fluorescencia y DAPI

La fluorescencia de ácidos nucleicos en el floema de 30 de 50 plantas de maíz con síntomas de la enfermedad se observó azul intenso, dentro de los tubos cribosos del floema, debido a la coloración específica de las bases de adenina y timina que se encuentran en mayor cantidad en los fitoplasmas, similar a lo consignado por Davis and Sinclair, 1998. La fluorescencia no se observó en todos los cortes de floema de muestras de plantas con síntomas de la enfermedad, ya que no todo el floema de una planta contiene fitoplasmas a niveles detectables por este método (Gibb *et al.*, 1995). No se observó fluorescencia en 10 plantas asintomáticas utilizadas como testigo negativo.

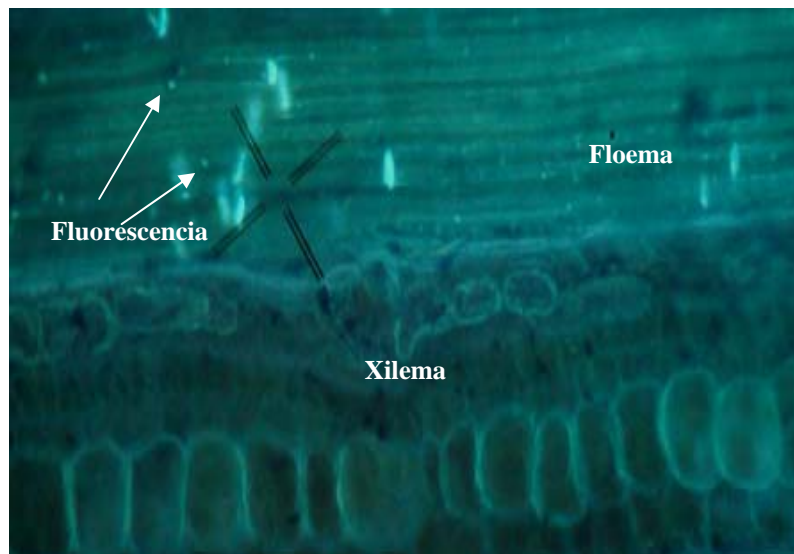


Figura 5. Corte longitudinal de hojas de plantas de maíz enfermas teñido con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol-2HCl), en el que se observa fluorescencia de fitoplasmas. Imagen con incremento a 40X.

La distribución desuniforme de los fitoplasmas en la planta, suele ser una desventaja en la aplicación de la técnica de fluorescencia, (Lee *et al.*, 1993), porque el área de tejido a analizar es muy pequeña y es posible tomar tejido donde no se encuentren fitoplasmas, a pesar de los síntomas. Esta técnica no es una prueba suficiente para demostrar la presencia de fitoplasmas cuando el resultado es negativo, sin embargo en el presente estudio la evidencia es positiva ya que si se detectaron en el floema de maíz (Figura 5).

3.3 Detección de fitoplasmas por PCR

3.3.1 Iniciadores universales y amplificación anidada

La presencia de fitoplasmas no se detectó con el par de iniciadores universales P1/P7 en las muestras de plantas sintomáticas de Cosoleacaque, Tlalixcoyan y Paso de Ovejas; sin embargo productos específicos de fitoplasmas de aproximadamente 1.2 kb se obtuvieron al utilizar los iniciadores R16F2n/R16R2 en una amplificación anidada (Figura 6). Cervantes *et al.*, (2004) reportaron que en una amplificación directa de muestras positivas de fitoplasmas que causan la pigmentación de flores y tallos de *Alstroemeria*, no se observó la amplificación del fragmento deseado por electroforesis hasta que fueron sometidas a una segunda amplificación anidada con el par de iniciadores P1/Tint, sin embargo muestras de hojas de *Vinca* que se emplearon en la misma reacción si evidenciaron la presencia en la amplificación directa y en la amplificación anidada. Al respecto Cervantes *et al.*, (2004) reportaron que la concentración de fitoplasmas podría, en algunos casos, estar en niveles no detectables para que la amplificación directa sea visualizada, como sucedió en el presente estudio.

Luna (2003) no reportó la amplificación de fitoplasmas con los iniciadores P1/P7 de muestras de nochebuena, rosa, conchita, crisantemo, guandú, frijol lima, papayo y manzano hasta que fueron sometidas a una reamplificación con el par de iniciadores P1/Tint, esto significa que la cantidad de DNA sintetizado fue muy baja en una primera reacción de amplificación directa, pero la amplificación exponencial del DNA sintetizado con otro par de iniciadores ayudó a la visualización del fragmento como se observa en la Figura 6.

La reacción de amplificación por PCR anidado muestra bandas definidas del fragmento esperado en la ubicación esperada, además la reacción fue realizada de manera correcta al obtener amplificación positiva y negativa de los testigos. Las muestras analizadas fueron positivas a fitoplasmas (Figura 6) y amplificaron un fragmento similar al que amplificó el testigo positivo.

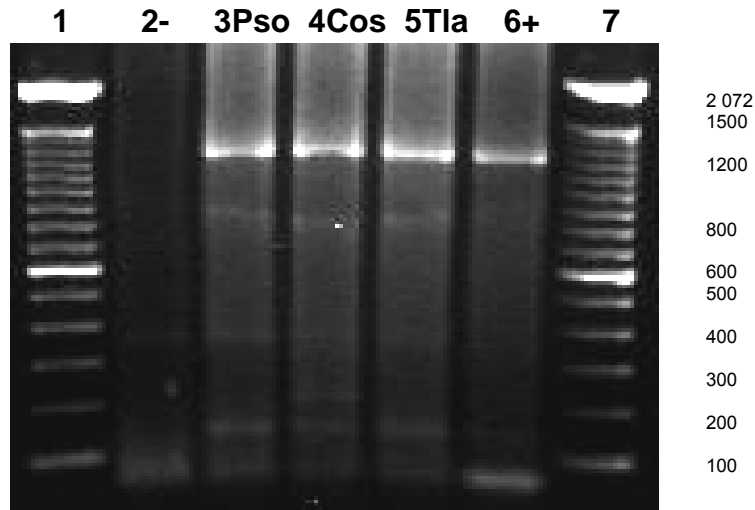


Figura. 6. Amplificación anidada de la secuencia 16S DNAr de fitoplasmas con el par de iniciadores universales P1/P7 y R16R2/R16F2. Carril 1y 7: Marcador 100 pb Invitrogen, Carril 2: Control negativo de agua libre de DNAsas y RNAsas, Carril 3: muestra positiva de maíz de Paso de Ovejas (1PSO), Carril 4: muestra positiva de maíz de Cosoleacaque (1COS), Carril 5: muestra positiva de maíz de Tlalixcoyan (1TLA), Carril 6: Control positivo de muestra infectada con el fitoplasma MBS (+) (University of California, Davis), Carril 7: Marcador 100 pb Invitrogen.

Las muestras de maíz que resultaron positivas a fitoplasmas tenían los siguientes síntomas: plantas de altura normal, con síntomas de amarillamiento y enrojecimiento en el borde de las hojas y con tres mazorcas (Paso de Ovejas, Ver.); plantas con proliferación de mazorcas y hojas en las brácteas (Tlalixcoyan, Ver.), y plantas con enrojecimiento generalizado en las hojas, tallos delgados, reducción de entrenudos y proliferación de mazorcas (Cosoleacaque, Ver).

Todas las muestras que se analizaron tuvieron el síntoma de enrojecimiento foliar, el cual describió Nault (1980) como síntoma de la enfermedad causada por el fitoplasma *Maize Bushy Stunt*. El síntoma de proliferación de mazorcas (tres o más) y reducción de entrenudos también es característico de una infección por fitoplasmas (Nault, 1980, Oliveira *et al.*, 2007), los tallos delgados y hojas en las brácteas no han sido descritos como causados por fitoplasmas.

3.3.2 Iniciadores específicos

Las muestras de los tres municipios, positivas a fitoplasmas mediante una amplificación anidada, con los iniciadores universales R16F2n/R16R2 también resultaron positivas al

fitoplasma MBS (Figura 7) y amplificaron un fragmento de 740 pb con los iniciadores MBSF1 y MBSR1 específicos para el fitoplasma MBS (Harrison, *et al.*, 1996).

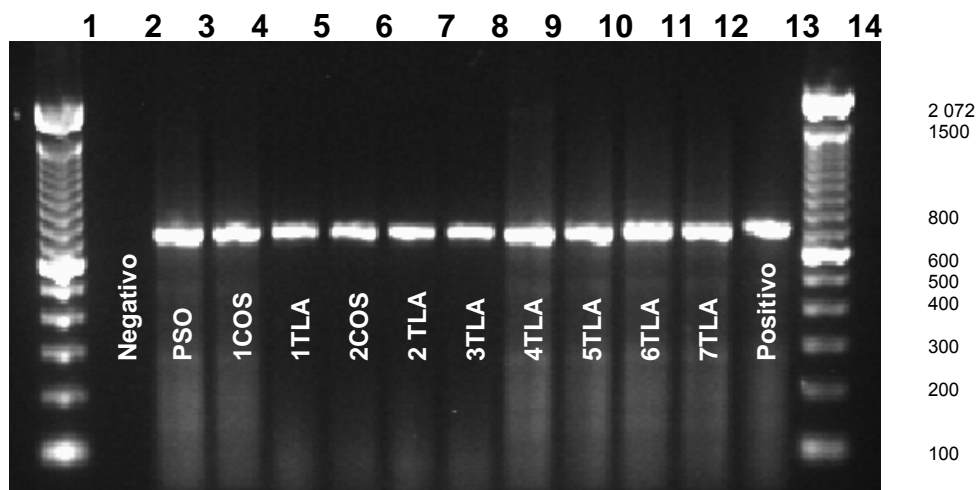


Figura. 7. Amplificación de la secuencia 16S DNAr de fitoplasmas con el par de iniciadores específicos MBSR1/MBSF1. Carril 1: marcador Invitrogen de 100 pb, carril 2: muestra negativa de agua, carril 3-12: muestras positivas de Cosoleacaque, Tlalixcoyan y Paso de Ovejas, carril 13: muestra testigo positiva de maíz infectada con el fitoplasma MBS (+) (University of California, Davis). Carril 14: marcador Invitrogen de 100 pb.

Las muestras 1PSO de Paso de Ovejas, 1COS y 2COS de Cosoleacaque y 2TLA a 6TLA de Tlalixcoyan resultaron positivas a la presencia del fitoplasma MBS. Las plantas de las parcelas muestreadas se encontraron en etapa de espiga y mostraron síntomas de amarillamiento y enrojecimiento foliar, proliferación de mazorcas y/o acortamiento de entrenudos, síntomas propios de una infección por fitoplasmas, de acuerdo a lo descrito por Nault, 1980. Solamente la muestra 7TLA provenía de plantas con brácteas en forma de hojas en posición arrosetada, abiertas con inflorescencia verde (Figura 4), sin embargo, este síntoma no se había descrito para fitoplasmas que atacan al maíz.

En el presente estudio se detectó e identificó la presencia del fitoplasma *Maize Bushy Stunt* a nivel molecular en las plantas de maíz sintomáticas (Figura 8). Los genotipos CP-562, 30F83, 30F92, Orca, 30F96, Nutria y Asgrow 7573 resultaron positivos a la presencia del MBS, mientras que 3086, 30F97 y CP-560 resultaron negativos, a pesar

de mostrar síntomas similares a los causados por este patógeno; posiblemente estas muestras estaban infectadas con otro patógeno que causó un síntoma similar.

En la reacción de PCR el control positivo amplificó en todas las repeticiones que se realizaron y se utilizaron diferentes concentraciones de DNA y reacción anidada de PCR para asegurar el resultado y en la técnica de serología también resultaron negativas a la presencia del virus MDMV y al virus MCDV en las tres repeticiones que se realizaron de la prueba. Por otro lado, el síntoma de enrojecimiento foliar se encontró también asociado a la bacteria *Burkholderia gladioli* en otras muestras de maíz de la misma región de estudio (Gijón et al., 2008).

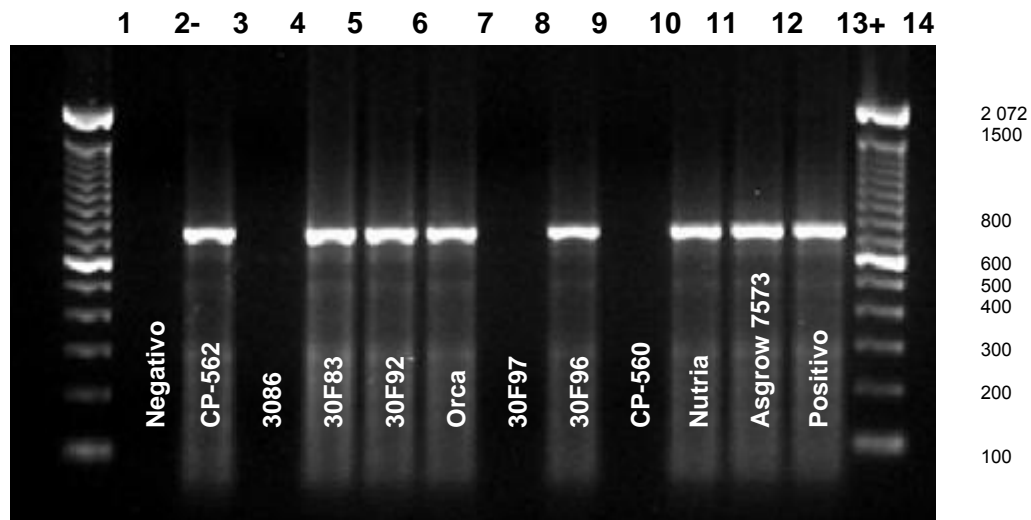


Figura. 8. Detección del fitoplasma *Maize Bushy Stunt* en 10 genotipos de maíz en Veracruz. Carriles 1 y 14: marcador molecular Invitrogen de 100 pb, Carril 2: negativo con agua, Carril 3: CP-562, Carril 4: 3086, Carril 5: 30F83, Carril 6: 30F92, Carril 7: Orca, Carril 8: 30F97, Carril 9: 30F96, Carril 10: CP-560, Carril 11: Nutria, Carril 12: Asgrow 7573 y Carril 13: Control positivo al MBS.

La presencia del fitoplasma MBS en México se reportó en 1980 por Nault, quién afirmó que la enfermedad conocida como achaparramiento del maíz es causada por dos organismos diferentes, espiroplasmas y fitoplasmas. Harrison *et al.* (1996) detectaron por métodos moleculares la presencia del fitoplasma MBS en aislamientos provenientes de Poza Rica, Ver., Texcoco y Tlaltizapan, Edo. de México. En el presente estudio también se confirmó molecularmente la presencia del fitoplasma MBS en los municipios de Tlaxicoyan, Paso de ovejas y Cosoleacaque, Ver.

3.3.3 Secuenciación de nucleótidos

La secuencia de la amplificación con iniciadores universales que se muestra a continuación, se alineó en el GenBank con varios fitoplasmas, dentro de los cuales están el Amarillamiento del Aster y *Maize Bushy Stunt* con un porcentaje de homología entre las secuencias comparadas de 99% en ambos casos (NCBI, GenBank).

```
CCCGAGCCTTCTGTTTTAAGACTAGCATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCA
CATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCT
GAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGT
GAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGG
AAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTG
CGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTAT
AAAACTGTTTtagctagagtaagatagaggcaagtggaattccatgtgtagtggtta
AAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTT
ACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAAC
ACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTG
ACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAA
ACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTAT
CAGTTG
```

La secuencia que se obtuvo con iniciadores específicos se depositó en el Genbank con clave de acceso EU840177 y dio un 99% de homología con la secuencia parcial que codifica el gen responsable de la producción de la proteasa ATP-dependiente del Zn y a la secuencia de la proteína hipotética (pam562) del fitoplasma MBS con 0% de error de 734 scores que se realizaron para la comparación de la secuencia obtenida con las secuencias depositadas en el Genbank.

3.4 Incidencia, severidad y distribución de la enfermedad

En 2006, el municipio de Cosoleacaque presentó la mayor incidencia media visual (26%) al achaparramiento, aunque hubo plantaciones con incidencias de 42 y 54% (Cuadro 3). En ese año todas las plantaciones muestreadas se sembraron con el genotipo AS7573, lo que sugiere que el genotipo, el ambiente, las fechas de siembra y el nivel poblacional del insecto vector (*Dalbulus maidis*) posiblemente influyeron en la incidencia de la enfermedad (Sierra *et al.*, 2007, Mendoza *et al.*, 2005 y Virla *et al.*, 2003). La ubicación de las parcelas muestreadas en cada región se muestra en el Cuadro 3. Sierra *et al.* (2007) encontraron incidencias del achaparramiento del maíz del 10% al 40% en Ignacio de la Llave, La Torrecilla y Cotaxtla Veracruz, en tanto que Mendoza *et al.* (2005) encontraron incidencias de hasta 45% en líneas endogámicas de maíz en Ursulo Galván, Ver.

Cuadro 3. Ubicación de las parcelas muestreadas en los municipios de Cosoleacaque, Tlaxicoyan y Paso de Ovejas, Veracruz, para la detección de fitoplasmas asociados con el achaparramiento del maíz en 2006 y 2007.

Clave	Municipio	Coordenadas		Altitud	Incidencia visual	Ciclo de muestreo
		Latitud Norte	Longitud Oeste			
1COS	Cosoleacaque	17.89274	94.63544	21	54	PV-07
2COS	Cosoleacaque	17.89663	94.63498	32	42	PV-07
3COS	Cosoleacaque	17.89242	94.63241	4	27	PV-07
4COS	Cosoleacaque	17.91579	94.62561	11	25	PV-07
5COS	Cosoleacaque	17.89521	94.62979	9	17	Inv-06
6COS	Cosoleacaque	17.89798	94.63171	23	12	Inv-06
7COS	Cosoleacaque	17.89006	94.63934	14	8	Inv-06
Media de Cosoleacaque					26.4	
1TLA	Tlaxicoyan	18.71789	96.12835	9	34	PV-06
2TLA	Tlaxicoyan	18.72726	96.11682	24	15	PV-06
3TLA	Tlaxicoyan	18.72762	96.11543	21	14	PV-06
4TLA	Tlaxicoyan	18.72784	96.11473	22	6	Inv-06/07
5TLA	Tlaxicoyan	18.71771	96.12835	12	3	Inv 06/07
6TLA	Tlaxicoyan	18.71789	96.11365	8.5	1	Inv-06/07
Media de Tlaxicoyan					12.2	
1PSO	Paso de Ovejas	19.11247	96.20810	25	12	OI-06
PromedioTotal					16.8	

La incidencia, distribución y severidad de la enfermedad por el fitoplasma MBS en una plantación del municipio de Tlaxicoyan se muestra en la Figura 9. El síntoma con

mayor frecuencia (114 frecuencias) fue: plantas de altura normal con hojas de bordes enrojecidos, seguido de plantas achaparradas con hojas de bordes enrojecidos y de plantas de altura normal con hojas de bordes enrojecidos y proliferación de mazorcas (9 frecuencias para ambos síntomas).

De acuerdo a lo descrito por Shurtleff (1980) y CIMMYT (2004), el síntoma de coloración rojiza y la proliferación de jilotes corresponden a la presencia del fitoplasma del MBS, el cual se corroboró con las pruebas moleculares del presente estudio. Plantas de altura normal con hojas de bordes enrojecidos y proliferación de mazorca y plantas achaparradas con hojas de bordes enrojecidos y proliferación de mazorca, se encontraron ubicadas en las orillas de la parcela. Estas plantas presentaban los síntomas severos indicando un estado avanzado de la enfermedad. La severidad de la enfermedad tuvo un efecto de orilla, que podría ser causada por insectos vectores que provienen de parcelas vecinas o de hospedantes alternos a la parcela. Plantas de maíz con alta severidad en la orilla sur de la parcela indican que la enfermedad pudo ser introducida del exterior, tal vez por insectos vectores como *Dalbulus maidis*, el cual se colectó en Tlalixcoyan y se identificó taxonómicamente.

La siembra de la parcela experimental de maíz en Tlalixcoyan se hizo al principio de la estación de lluvias (Abril, 2007) cuando la población de insectos vectores es alta; posiblemente los insectos que se encontraban en plantas jóvenes de la parcela vecina migraron a la parcela experimental. Las orillas norte y este de la parcela en estudio presentaron menor severidad (Figura 9) posiblemente porque colindaban con una superficie no cultivada, al respecto Weintraub y Beanland (2006) mencionaron que los insectos sospechosos de distribuir enfermedades causadas por fitoplasmas pueden provenir del exterior y alimentarse de una primer planta, inocularla, y moverse hacia plantas adyacentes y posteriormente moverse fuera del área inmediata. Varón y Sarria, (2007) reportaron que adultos de *D. maidis* invaden al maíz recién germinado, se alimentan de las plantas y las infectan, así que posiblemente las orillas de la parcela con plantas de menor severidad fueron infectadas por una población baja de insectos vectores o por la transmisión secundaria con insectos vectores de plantas adyacentes.

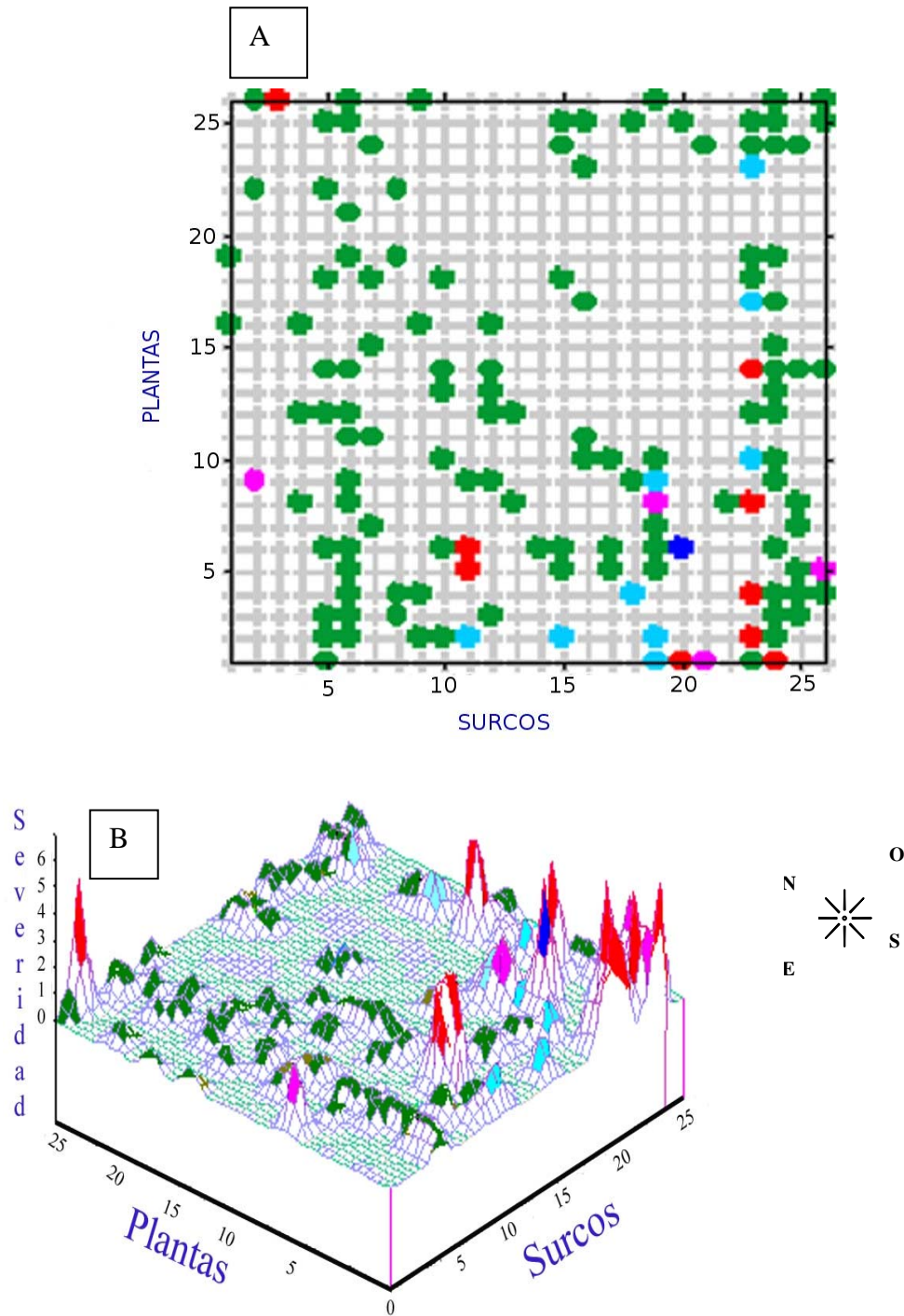


Figura 9. Distribución de la incidencia (A) y severidad (B) de la enfermedad por el fitoplasma *Maize Bushy Stunt* en la var. Asgrow 7573 en el ciclo primavera-Verano 2007 (Abril-Agosto), en Tlaxicoyan, Veracruz.

Clase 0: Planta sana (□), Clase 1: Planta de altura normal con hojas de bordes enrojecidos (■), Clase 2: Planta achaparrada con hojas de bordes enrojecidos (■), Clase 3: Plantas de altura normal con proliferación de mazorca (■), Clase 4: Planta achaparrada con proliferación de mazorca (■), Clase 5: Plantas de altura normal con hojas de bordes enrojecidos y proliferación de mazorca (■) y Clase 6: Planta achaparrada con hojas de bordes enrojecidos y proliferación de mazorca (■).

Plantas con mayor severidad (Clase 3 y Clase 5) posiblemente fueron infectadas en etapas tempranas de su desarrollo y posiblemente actuaron como focos de infección hacia el resto de plantas de la parcela de tal manera que plantas de altura normal con hojas de bordes enrojecidos (Clase 1) se distribuyeron mayoritariamente en toda la parcela.

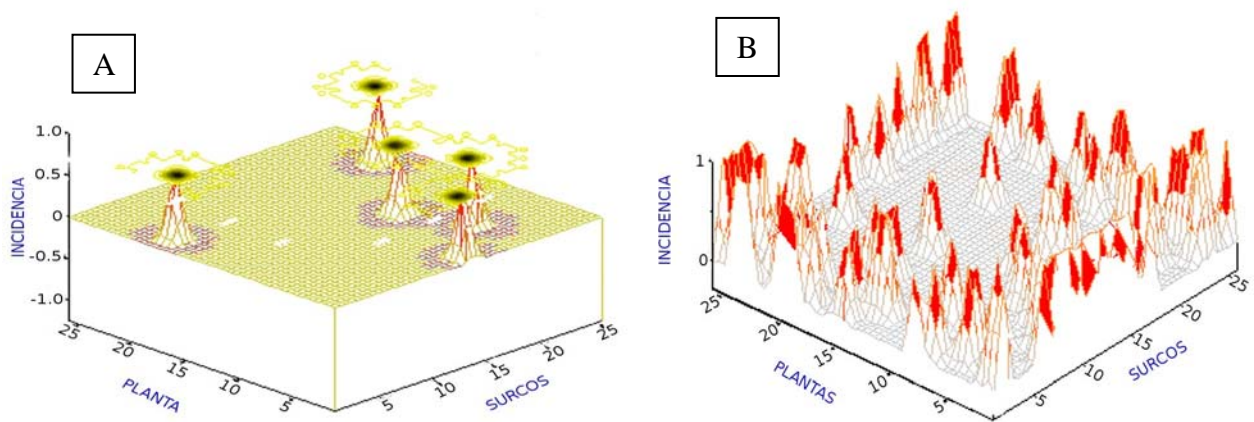


Figura 10. Distribución espacial de la incidencia del achaparramiento del *Maize Bushy Stunt* en el cultivo de maíz, A) invierno 2006 (Nov 2006-Feb 2007) y B) primavera-verano 2007 (Abr-Ago 2007) en Tlalixcoyan, Ver.

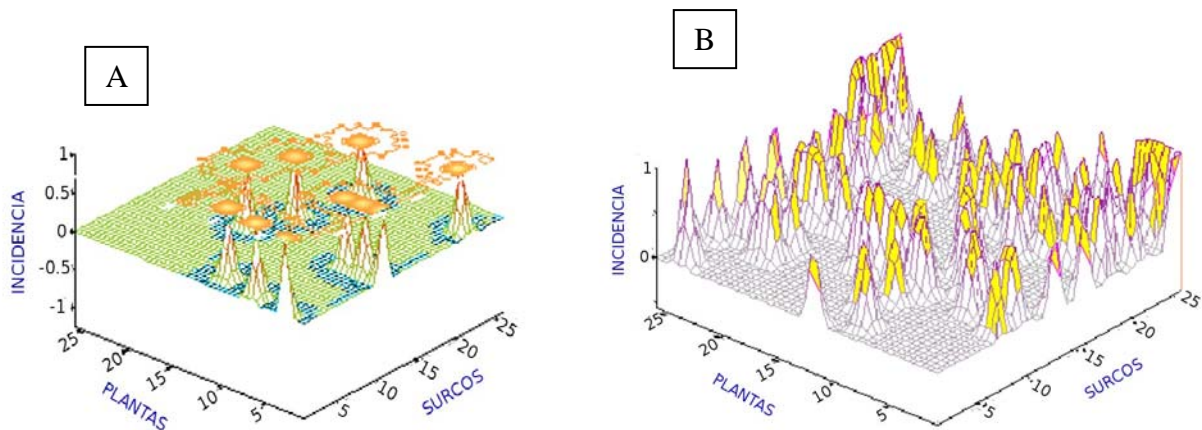


Figura 11. Distribución espacial de la incidencia del achaparramiento del *Maize Bushy Stunt* en el cultivo de maíz. A) otoño-invierno 2006 (Ago-Dic) y B) primavera-verano 2007 (Mar-Ago) en Cosoleacaque, Ver.

Moya (2002) concluyó que *Dalbulus elimatus* en México habita en maíz cultivado bajo irrigación durante la estación seca, como sucede en Tlalixcoyan ya que su presencia se confirmó en el cultivo de maíz en las parcelas en estudio, mediante una colecta e identificación del insecto. Las plantas de estas áreas agrícolas posiblemente son las hospedantes del insecto vector y de las enfermedades que transmite.

Dalbulus elimatus y *D. maidis* son los principales vectores del fitoplasma MBS (Nault, 1980). El fitoplasma *Maize Bushy Stunt*, es transmitido de forma persistente propagativa y se reproduce en 25 días dentro del vector. Después de un periodo de latencia el vector es capaz de propagar al patógeno a plantas sanas (Nault, 1997). La presencia del vector *D. maidis* dentro de parcelas afectadas en el presente estudio puede ser un indicativo de su relación como vector del fitoplasma MBS en esta región, sin que esto se comprobara en este estudio.

Moya (2002) y Ramírez *et al.* (1975) consignaron que la población de *Dalbulus elimatus*, el insecto vector del fitoplasma del maíz MBS (Lee *et al.*, 1993 y Nault, 1980), es baja en cultivos de maíz invernales bajo condiciones de riego, lo cual se asocia a una baja incidencia de la enfermedad encontrada en el presente estudio (Figuras 10 y 11).

La tasa alta de incidencia de la enfermedad registrada en la época de muestreo, ciclo primavera-verano 2007 puede deberse a una alta población del vector, la cual no se determinó en este estudio. Ramírez *et al.* (1975) encontraron una alta correlación entre el número de plantas infectadas y las poblaciones del vector. Las poblaciones de cicadelidos son mayores en primavera y verano, (Kirkpatrick, 1987). La incidencia de la enfermedad en Tlalixcoyan y Cosoleacaque fue más alta en el ciclo de temporal primavera-verano (Figuras 10 y 11) y coincide con los meses de mayor precipitación que son junio a septiembre (García, 1987). Nault (1998) mencionó que la primera actividad de búsqueda del hospedero por *Dalbulus* es estimulada por las primeras lluvias, razón por la que posiblemente exista una mayor incidencia de la enfermedad en el ciclo de cultivo primavera-verano.

3.5 Incidencia y rendimiento

En el ciclo primavera-verano 2007 hubo diferencias significativas en las variables evaluadas pero no en el ciclo de invierno 2006-2007 (Noviembre a Marzo) (Cuadro 4 y Figura 10), lo cual concuerda con lo que reportaron Tosquy *et al.*, (2005) quienes detectaron diferencias altamente significativas en rendimiento de grano, severidad de la enfermedad y en el porcentaje de mazorcas podridas al evaluar visualmente el comportamiento en híbridos de maíz en Tlalixcoyan y San Andrés Tuxtla, Ver. en el ciclo primavera-verano 2002, al achaparramiento del maíz. En el presente trabajo se demostró la significancia de las variables evaluadas y se identificó molecularmente al MBS.

Castañón *et al.* (2003) reportaron la probabilidad de que en el sur de México las pérdidas por el achaparramiento del maíz se incrementen debido a la mala distribución de las lluvias y a que durante el crecimiento y desarrollo de la planta se presentan las condiciones climáticas adecuadas para el insecto vector. Es posible que la significancia encontrada en las variables evaluadas en el ciclo primavera-verano 2007 se deban a un incremento poblacional del insecto vector que resultó en una mayor incidencia de la enfermedad. Sierra *et al.*, (2007), Tosquy *et al.* (2005) y Palafox *et al.* (2006) también encontraron efectos en el rendimiento de híbridos de maíz a síntomas del complejo del achaparramiento durante el ciclo primavera-verano.

El análisis de medias muestra que el rendimiento osciló entre 4 y 6 ton ha⁻¹ en peso de mazorca y en peso de semilla entre 3 a 5 toneladas; la incidencia varió del 10% a 27% y la severidad del 0.05 a 0.3% (Cuadro 4).

ORCA, AS-7573 y 39F97 resultaron superiores en rendimiento de peso de mazorca y peso de semilla. En la Figura 12 se observa que el rendimiento alto de ORCA (6.1 ton ha⁻¹) probablemente se deba a la baja severidad (0.14) e incidencia (11%) de la enfermedad, resaltando la posible tolerancia de este genotipo ante la presencia del MBS en Tlalixcoyan.

Cuadro 4. Comparación de medias de las variables evaluadas en 10 genotipos de maíz expuestos naturalmente a la infección del *Maize Bushy Stunt* en Tlalixcoyan, Ver. Ciclo primavera-verano 2007

GEN	RTO	MAZTOT	MAZENF	DISMAZ	PSEM	PESENF	DIFPESO	DISMREND	INCID	SEVER
ORCA	6189.6 a	58438 a	5937.5b	10.15 cd	4714.5ab	798.07 b	126.50 dc	13.68 ab	11.20 e	0.14 c
AS-7573	5756.8 ab	50938abc	10312.5a	20.21 a	5445.2a	629.12 cd	170.31abc	21.30 dc	18.09 bc	0.25 ab
30F97	5391.8abc	42188bc	4062.5bc	9.51 ed	4617.9ab	1104.46 a	154.50abcd	12.29 a	16.91 cd	0.15 c
30F96	5379.5abc	53333ab	2916.7c	5.59 e	4228.5bc	408.41 e	98.21 d	19.32 bcd	13.06 de	0.15 c
NUTRIA	5123.7abc	42188bc	5000.0bc	11.94 bcd	4050.3bc	689.27bcd	196.84 a	22.35 d	10.21 e	0.15 c
30F83	5119.3abc	47188abc	10000.0a	21.25 a	4200.1bc	706.76 bc	208.62 a	22.78 d	26.76 a	0.29 a
CP562	4509.4 bc	37188c	5625.0bc	15.28 b	3376.1c	686.88bcd	128.70 bcd	15.76 abc	11.58 e	0.05 d
3086	4299.7bc	40000bc	5625.0bc	14.14 bc	3384.2c	542.50 de	175.22 abc	24.43 d	13.73 de	0.17 c
30F92	4249.8 bc	38125bc	5937.5b	15.49 b	3092.5c	726.16 bc	185.57 ab	20.44 dc	18.95 bc	0.29 a
CP560	4155.9 c	36563c	5000.0bc	13.63 bcd	4134.6bc	641.02 bcd	209.98 a	24.64 d	21.39 b	0.18 bc
Media	4988	44391	6121	13.92	4124.38	679.81	165.41	19.96	16.19	0.18
CV (%)	12.61	14.02	19.38	12.85	11.48	9.13	13.02	12.38	10.42	16.77

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales, Tuckey ($\alpha \leq 0.05$).

RTO=Rendimiento en Kg ha⁻¹; MAZTOT=Nº mazorcas totales cosechadas (piezas por ha); MAZENF= Nº mazorcas enfermas (piezas por ha); DISMAZ= Disminución de mazorcas (%); PSEM= Peso en Kg ha⁻¹ de semilla, PESENF= Peso en Kg ha⁻¹ de semilla enfermas, DIFPES=Diferencia de peso de semilla sana menos enferma en porcentaje, DISMREND= Disminución de rendimiento en peso de semilla (%) , INCID=Incidencia, SEVER= Severidad.

AS-7573 presentó una alta incidencia (18%) del MBS, un gran número de mazorcas enfermas, y una severidad alta (0.25), sin embargo su rendimiento en peso de mazorca (REND) y en peso de semilla (PSEM) fue estadísticamente similar al de Orca (Figura 12); posiblemente esta es la razón de que AS-7573, además de su precocidad sea ampliamente cultivada en la zona de estudio. Aguiluz *et al.* (1995) encontraron un alto rendimiento de grano (4.2 ton ha⁻¹) en el híbrido B-833 con un alto porcentaje (22.8%), de plantas con síntomas visuales del complejo del achaparramiento del maíz. Sierra *et al.* (2007) reportaron rendimientos de 4.5 ton ha⁻¹ en híbridos de maíz a pesar de incidencias del achaparramiento del maíz hasta del 21% en Tlalixcoyan. Lo anterior indica que algunos híbridos son altamente rendidores a pesar de la alta incidencia de esta enfermedad como sucedió en el presente estudio con AS-7573 ante la presencia del MBS.

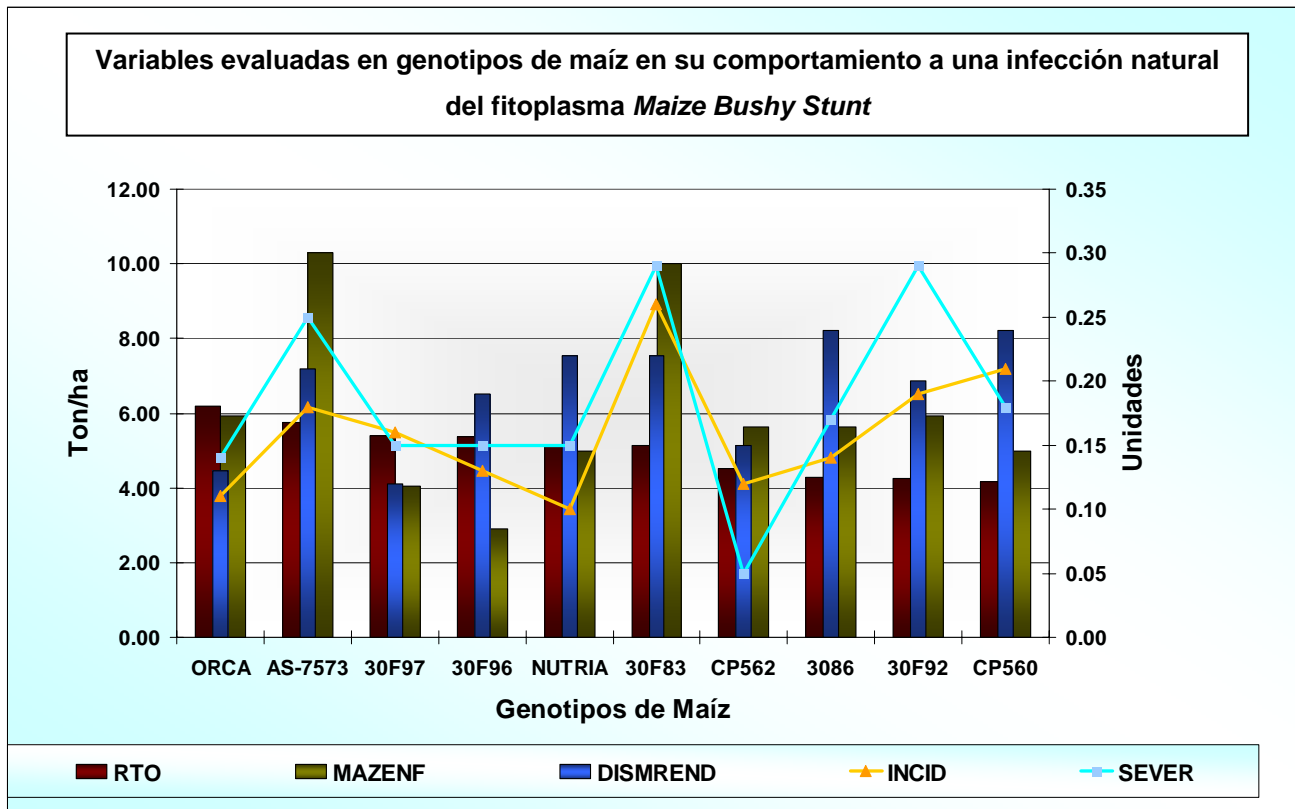


Figura 12. Genotipos evaluados en su comportamiento a una infección natural del fitoplasma MBS. RTO=Rendimiento en peso de mazorca, MAZENF=mazorcas enfermas, DISMREND=Disminución del rendimiento, INCID=Incidencia del fitoplasma MBS, SEVER= Severidad de la enfermedad del MBS.

CP562 presentó baja severidad e incidencia pero poco rendimiento, en tanto que 30F83 fue severamente afectada sin que esto afectara su rendimiento (REND), el cual fue estadísticamente similar al de ORCA.

Los genotipos ORCA, NUTRIA y CP562 tuvieron los valores más bajos de incidencia a la enfermedad y en rendimiento ORCA y NUTRIA fueron estadísticamente superiores (Figura 12). Lo anterior concuerda con lo que reportaron Oliveira *et al.* (2002), quienes encontraron una diferencia altamente significativa con una probabilidad de 0.01% en la producción de grano seco en plantas de maíz inoculadas con el fitoplasma *Maize Bushy Stunt*, el espiroplasma *Spiroplasma kunkelii* y su combinación, siendo la reducción de la producción de 17, 49 y 54% respectivamente. Esta misma tendencia de reducción se observó en las variables altura de la planta y producción de peso seco de grano en las diferentes variedades inoculadas con los dos patógenos y su combinación,

aunque no existió una diferencia estadística entre variedades debido al coeficiente de variación alto (CV=66,7%).

Magalhães *et al.*, 2005 observaron que los rendimientos de plantas sanas (220.82 g de grano seco) y las infectadas con el fitoplasma MBS (202.24 g de grano seco) fueron iguales estadísticamente y superiores a los obtenidos en las plantas inoculadas con el espiroplasma (79.15 g de grano seco). Los genotipos CP562 y 3086 presentaron baja incidencia (11.5% y 13.7%) en contraste con 30F92 y CP560 que registraron incidencia (18.9% y 21.3%). Probablemente el efecto de la enfermedad sobre el rendimiento este determinado por las características genéticas de tolerancia de los genotipos bajo determinado ambiente. Al respecto Oliveira *et al.* (2002) mencionaron que la magnitud de la reducción en la producción causada por mollicutes en diferentes cultivares de maíz depende de la frecuencia de plantas susceptibles a la infección por estos patógenos.

Cuadro 5. Correlación de las variables evaluadas en 10 genotipos de maíz expuestos naturalmente a la infección del fitoplasma MBS en Tlalixcoyan, Ver. Ciclo primavera-verano 2007.

	RTO	MAZTOT	MAZENF	DISMAZ	PSEM	PESENF	DIFPES	DISMREND	INCID	SEVER
RTO	1.0000	0.7716	0.2286	-0.1630	0.7062	0.1937	-0.3474	0.4329	-0.1809	-0.1452
MAZTOT		1.0000	0.3402	-0.1482	0.4562	-0.0892	-0.3974	0.2723	-0.1618	-0.0512
MAZENF			1.0000	0.8667	0.2422	-0.0514	0.2775	-0.2077	0.4378	0.5394
DISMAZ				1.0000	0.0055	-0.0619	0.4630	-0.3608	0.5485	0.5923
PSEM					1.0000	0.1738	-0.1128	0.2216	0.0847	-0.0066
PESENF						1.0000	0.1728	0.5820	0.1006	-0.0059
DIFPES							1.0000	-0.6804	0.5139	0.4389
DISMREND								1.0000	-0.3227	-0.3279
ASPEC									1.0000	-0.2332
INCID										1.0000
SEVER										

RTO=Rendimiento; MAZTOT=Mazorcas totales cosechadas; MAZENF=Mazorcas enfermas
DISMAZ=Disminución de mazorcas; PSEM=Rendimiento en peso de semilla, PESENF=Peso de semillas enfermas, DIFPES=Diferencia de peso, DISMREND=Disminución de rendimiento en peso de semilla, ASPEC=Aspecto del cultivo, INCID=Incidencia y SEVER=Severidad

El análisis de correlación del Cuadro 5 muestra que la incidencia se relacionó de manera positiva con la disminución de la cantidad de mazorcas, con el número de mazorcas enfermas y con la diferencia de peso en semilla.

Sierra *et al.* (2007) encontraron correlación entre incidencia al achaparramiento identificado visualmente ($r=-0.50^{**}$) con la presencia de mazorcas pequeñas, chupadas y sin grano. Tosquy *et al.*, (2005) encontraron que el porcentaje de pudrición de mazorcas, asociado al achaparramiento del maíz, identificado visualmente, tuvo un efecto negativo y altamente significativo en el rendimiento de grano en San Andrés Tuxtla, Ver.

Sierra *et al.* (2007) encontraron correlación negativa y significativa (-0.70^{**}) del porcentaje de achaparramiento con rendimiento de grano y de porcentaje de achaparramiento con severidad del daño (-0.64^{**}). En el presente estudio el peso de granos enfermos (DIFPES) correlacionó con la incidencia (0.51) y con la severidad (0.44). Se encontró una correlación positiva entre la severidad y la cantidad de mazorcas enfermas ($r=0.54^{**}$) y entre la incidencia y la severidad ($r= 0.69$) del MBS, lo cual concuerda con Sierra *et al.* (2007) quienes encontraron una correlación altamente significativa ($r=0.86^{**}$) entre estas dos variables.

IV. CONCLUSIONES

1. La enfermedad del maíz caracterizada por síntomas de amarillamiento, enrojecimiento y posterior quemado de hojas, secado de la planta, pudrición del elote, proliferación de mazorcas, jilotes raquíuticos, falta de fecundación y granos vanos, pudrición vascular en tallo, franjeado foliar, necrosis en la vaina de la hoja, manchas blancas en las brácteas, necrosis de la nervadura central y deformación del jilote, que apareció con características epidémicas y alarmantes en el 2003-04 en la variedad Asgrow 7573 en los municipios de Tlalixcoyan, Paso de Ovejas y Cosoleacaque, Ver., es un síndrome asociado a varios microorganismos, entre los cuales, se identificó la presencia del fitoplasma *Maize Bushy Stunt*.
2. La incidencia del MBS se asoció a los síntomas de amarillamiento y enrojecimiento foliar, achaparramiento de la planta, proliferación de mazorcas y jilotes raquíuticos.
3. La incidencia y severidad del síndrome en plantaciones comerciales de maíz Asgrow 7573 disminuyó en forma natural a niveles insignificantes en el 2007.

V. LITERATURA CITADA

- Aguiluz, A., Navarro, E., Guerra, F., Córdova, H., y Oyervides, A. 1995. Evaluación de cuatro ciclos de selección para resistencia al achaparramiento del maíz en la población 73¹. *Agronomía mesoamericana* 6:88-22.
- Barros, T. S. L., Davis, R. E., Resende, R. O., y Dally, E. L. 2001. Design of polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. *Plant Disease* 85:475-479.
- Castañón, N. G., Hidalgo, H. C., y Jeffers, D. 2003. Heterosis en siete líneas de maíz para tolerancia al achaparramiento y rendimiento de grano. *Bioagro* 15: 65-73.
- Cervantes, D. L., Zavaleta M. E., Rojas, M. I., Alanís, M. I., y Ochoa M. L. D. 2004. Primer reporte de la presencia de fitoplasmas en plantas de *Alstroemeria* sp. en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:135-139.
- Crowther, J. R. 2001. *The ELISA Guidebook*. Humana Press. Totowa, New Jersey. 415 p.
- Davis, R. E., and Sinclair, W. A. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology* 88:1372-1376.
- Deng, S., and Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14:53-61.
- García, E. de M. 1987. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Copen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). México. Universidad Autónoma de México. 217 p.
- Gibb, K. S., Pandovan, A. C., and Morgen, B. D. 1995. Studies on sweet potato little leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Molecular Plant Pathology* 85: 169-174.
- Gijón, H. A., Téliz, D., Cárdenas, S. E., De León, C., Mora, A. A., Mejía, S. D. y de la Torre, A. R. 2008. Leaf stripe and stem rot caused by *Burkholderia gladioli*, a new disease of maize in México. *Plant disease*. 92:1249.
- Harrison, N. A., Richardson P. A., and Tsai, J. H. 1996. PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. *Plant Disease* 80:263-269.

- Kirkpatrick, B. C., Stenger, T. J., and Purcell, A. H. 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism using consecutive 350 nm thick sections. *Phytopathology Z.* 115:368-374.
- Lee, I. M., Hammond, R., Davis, R. E., and Gudersen, D. E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834-842.
- Luna, E. G. 2003. Caracterización molecular de fitoplasmas presentes en especies hortícolas. Tesis de maestría. Fitopatología. Colegio de postgraduados Campus Montecillo, México, 72 p.
- Magalhães, P. C., Oliveira De, E., Souza, R. P. I., Durães, O. M. F., Oliveira, M. C., y De Oliveira, E. A. 2005. Alterações nos níveis relativos de açúcares solúveis totais e de proteínas em plantas de milho infectadas com mollicutes. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 4:335-343.
- Mendoza, E. M., López, B. A., Latournerie M. L., Rangel, L. J. A., Ramírez, P. J. G., Rodríguez, H. S.A., y Castañón, N. G. 2005. Análisis de medias generacionales para estimar parámetros genéticos de la resistencia al achaparramiento en maíz. *Agronomía Trop.* 55:429-446.
- Moya, R. G. 2002. Distribución y habitats de *Dalbulus* spp. (Homoptera:Cicadellidae) durante la estación seca de México. *Acta Zool. Mex.* 85: 119-128.
- Nault, L. R. 1980. *Maize Bushy Stunt* and corn stunt: A comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. *Phytopathology* 70: 659-662.
- Nault, L. R. 1997. Arthropod transmission of plants viruses: A new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* 90:521-541.
- Nault, L.R. 1998. *Dalbulus maidis*: Identification, Biology, Ecology and Pest Status. p. 18-21. In *Diagnosing Maize Diseases in Latin America* (Eds. C. Casela, R. Renfro and A.F. rattiger). ISAAA Briefs No. 9. ISAAA: NY. 57 p.
- NCBI, 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, consulta Abril 2008.
- Oliveira, E., Santos, C. J., Magalhães, C. P., y Cruz, I. 2007. *Maize Bushy Stunt* phytoplasma transmisión by *Dalbulus maidis* is affected by spiroplasma acquisition and environmental conditions. *Bulletin of insectology* 60: 229-230.

- Oliveira, E., Martins, O. C. M., De Souza, R. P. I., Magalhães, P. C., y Cruz, I. 2002. Enfezamientos en milho: Expressão de sintomas foliares, detecção dos mollicutes e interações com genotipos. *Rev. Bras. de Milho e Sorgo* 1:53-62.
- Palafox, C. A., Tosquy, V. O. H., Sierra, M. M., Zambada M. A., y Córdova, O. H. 2006. Híbridos trilineales de maíz comunes y de alta calidad de proteína para Veracruz, México. *Agronomía Mesoamericana* 17:201-206.
- CIMMYT, Programa de Maíz. 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México, D. F.; Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo. CIMMYT. 123 p.
- Ramírez, J. L., De León, C., García, C., y Granados, R. G. 1975. *Dalbulus guevarai* (DeL.) nuevo vector del achaparramiento del maíz en México: Incidencia de la enfermedad y su relación con el vector *Dalbulus maidis* (DeL and W.) en Muna, Yucatán. *Agrociencia* 22:39-49.
- Semüller, E. 1976. Investigations to demonstrate mycoplasma-like organisms in disease plants by fluorescent microscopy. *Acta Horticulturae* 67:109-112.
- Sierra, M. M., Palafox C. A., Becerra L. E. N., Córdova O. H., Espinosa C. A. y Rodríguez M. F.A. 2007. Comportamiento de híbridos de maíz con alta calidad de proteína, por su buen rendimiento y tolerancia al achaparramiento. *Agronomía Mesoamericana*. 18: 93-101.
- Shurtleff, C. M. 1980. Compendium of corn diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul. Minnesota, U. S. A. 105 p.
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Lorenz, K. H., Seemüller, E., and Kirpatrick, B. C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S 23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2988-2993.
- Sutula, C., Gillet, J., Morrissey, S., and Ramsdell, D. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Dis.* 70:722-726
- Tosquy, V. O. H., Palafox, C. A., Sierra, M. M., Zambada, M. A., Martínez, M. R. y Granados, R. G. 2005. Comportamiento agronómico de híbridos de maíz en dos municipios de Veracruz, México. *Agronomía Mesoamericana* 16:7-12.

- Varón de A. F. y Sarria V. G. A. 2007. Enfermedades del maíz y su manejo. Compendio ilustrado. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y de la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas, Fenalce. Producción Editorial Diagramación, impresión y encuadernación. Palmira, Colombia. 56 p.
- Virla, E. G., Paradelli, S. L., y Diez, P. A. 2003. Estudios bioecológicos sobre la chicharrita del maíz *maidis* (Insecta-Cicadellidae) en Tucumán (Argentina). Bol. San. Veg. Plagas, 29:17-25.
- Weintraub, P. G., and Beanland, L. 2006. Habitat components of phytoplasma disease epidemiology. p. 100-101. in: Insect vectors of phytoplasmas. Annu. Rev. Entomol. 51:91-111.