

ISBN: 970-27-0770-6

***Spiroplasma kunkelii* (MYCOPLASMATALES: SPIROPLASMATACEAE), EN SU VECTORIZACIÓN POR *Dalbulus maidis* (HEMIPTERA: CICADELLIDAE) DURANTE LA ESTACIÓN SECA EN EL CENTRO DE MÉXICO.**

**Verónica Palomera Avalos, Alma Villalobos Arámbula, Anne Santerre, Patricia Castro y Eneida Araceli López Arias**  
**Departamento de Biología Celular y Molecular**

**Gustavo Moya-Raygoza**  
**Departamento de Botánica y Zoología**

### **Introducción**

La chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) es el principal vector de la bacteria *Spiroplasma kunkelii*. Esta bacteria provoca el achaparramiento del maíz (*Zea mays*) y causa pérdidas importantes en los cultivos en América Latina (Nault 1989, 1990). Aunque *D. maidis* es común en cultivos de maíz (*Zea mays*) sembrados en altitudes bajas, se le puede encontrar esporádicamente hasta 3,200 m (Nault 1990; Moya-Raygoza *et al.*, 2002). Este insecto se encuentra en el centro de México en maíz (*Zea mays*) que se cultiva en el verano, generalmente en altitudes superiores a los 1,000 m y también en el maíz (*Zea mays*) cultivado durante todo el año, en altitudes inferiores a los 1,000 m. El espiroplasma, se distribuye preferentemente en altitudes bajas, y es común encontrar plantas de maíz (*Zea mays*) con síntomas por la infección de *S. kunkelii* desde el nivel del mar hasta los 1,000 m (Davis 1973, 1977; Nault 1983; Moya-Raygoza *et al.*, 2002).

Durante la estación seca en altitudes altas en México, las chicharritas adultas son expuestas a temperaturas que frecuentemente disminuyen por varias horas bajo (0°C), particularmente en la noche (Larsen *et al.*, 1993). Las chicharritas del maíz que sobreviven al invierno como adultos en las regiones elevadas de México están expuestas a heladas frecuentes, por lo tanto *S. kunkelii* podría proporcionar una posible ventaja a dichas poblaciones (Nault 1990).

El maíz (*Zea mays*) habitado por adultos de *D. maidis* en las partes altas de México desaparece en el otoño y no reaparece hasta el inicio de las lluvias cuando se vuelve a sembrar maíz (*Zea mays*) en los campos (Larsen *et al.*, 1992). La estación seca en México ocurre de noviembre a mayo y se caracteriza por bajas precipitaciones, temperaturas bajas y días cortos (Larsen *et al.*, 1992, 1993). En lugares de altitudes bajas en donde el agua está disponible por irrigación, se puede producir maíz durante el invierno (Ebbert y Nault 1994) y encontrar adultos de *D. maidis* (M-R G., observación personal).

Estudios anteriores han demostrado que existe un mutualismo entre *S. kunkelii* y el vector *D. maidis* (Ebbert y Nault 2001), aunque esto sólo se ha visto a nivel de laboratorio, así *S. kunkelii* le confiere mayor sobrevivencia a la chicharrita del maíz en periodos de estación seca. Sin embargo, hasta ahora bajo condiciones naturales nadie ha demostrado si *S. kunkelii* está adentro del insecto. El objetivo de este trabajo fue determinar si *S. kunkelii*

pasa la estación seca dentro de su vector *D. maidis* en dos tipos de condiciones de cultivo (maíz bajo irrigación y maíz de secano).

## **Materiales y métodos**

### Colecta de organismos

La colecta de *D. maidis* adultos se llevo a cabo con una red de golpeo en follaje de maíz (*Zea mays*) o en pastos que crecieron dentro de los ex-cultivos de maíz y fueron identificados según las claves de Triplehorn y Nault (1985). La colecta se efectuó la última semana de cada mes desde octubre de 2000 hasta junio de 2001 y de octubre de 2003 hasta junio de 2004. El muestreo se realizó en dos localidades en donde el maíz se cultiva durante todo el año: Coquimatlan, Colima, Colima y en Ayuquila, El Grullo, Jalisco, y en dos localidades en donde el maíz es cultivado durante el verano: Uxmala, Sayula y en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Zapopan, ambas del estado de Jalisco, caracterizado por que el maíz es cultivado durante la estación lluviosa (mayo a octubre o noviembre), mientras que durante la estación seca (noviembre a mayo) crecen pastos dentro de las parcelas donde se cultivo maíz durante la estación lluviosa. Los adultos capturados fueron transportados vivos al laboratorio, donde fueron identificados y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador (Nuair – NU6514) para posteriormente determinar individualmente la presencia de *S. kunkelii* con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### Metodología

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo con el protocolo de Aljanabi y Martínez (1997). Este protocolo se basa en el uso de una alta concentración de sales para la precipitación del material genético y el uso de la proteinasa K para la degradación de proteínas que contaminan las soluciones enriquecidas en ácidos nucleídos. El rendimiento de ADN reportado con este método es de 500 a 800 ng  $\text{mg}^{-1}$  de tejido fresco con una pureza mayor a 1.77 (260/280 DO). La calidad y cantidad de ADN obtenidas con este protocolo fueron suficientes para poder realizar la PCR.

El gen “spiralin” de la bacteria *S. kunkelii* se amplificó con la técnica de PCR. Se utilizaron dos cebadores específicos para amplificar este gen del espiroplasma: cebador 5' - 3' SPIR(2)\_for GAGAAGACTTTTATCGATTTTAGC y el cebador 5' - 3' SPIR(485)\_rev TGTAACATTTGTTACATCGGC (MWG Oligonucleótidos; High Point, NC, USA).

Spiralin es la lipoproteína más grande de la membrana de los espiroplasmas y la secuencia completa de este gen spiralin se encuentra disponible en GenBank con el número de acceso U57659.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , siguiendo el método de Barros *et al.* (2001), cada reacción contenía: 5  $\mu\text{L}$  de ADN (40 ng/ $\mu\text{L}$ ), 0.4  $\mu\text{M}$  de cada primer, 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, amortiguador 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 1.5 Unidades de *Taq* ADN polimerasa recombinante (Invitrogen, 5 U/ $\mu\text{L}$ ). Las muestras se amplificaron en un termociclador (MJ Research, Inc PTC-100.) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 min, 30 ciclos de desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, alineación a  $55^{\circ}\text{C}$  por 1 min, elongación a  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 min, finalmente, elongación prolongada a  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 min.

Además de haber procesado individualmente los especímenes colectados se incluyó en cada experimento de PCR cuatro controles. El primer control fue ADN extraído de *D.*

*maidis* previamente infectados por medio de plantas de maíz con la bacteria, el segundo agua, el tercero adultos de *D. maidis* infectados (inyectados) con el espiroplasma y el cuarto adultos sanos.

El fragmento amplificado se separó en geles de agarosa (1%) usando amortiguador Tris-borate EDTA 1X (TBE), las muestras se corrieron en promedio a 80 voltios por dos horas y el material genético se tiñó con bromuro de etidio para visualizar la banda de aproximadamente 500 pb en un transiluminador de luz UV (UVP-TS20E). Se tomaron fotografías de los geles con una cámara polaroid y con el sistema de fotodocumentación EDAS (Kodak Digital Science 1D v. 3.0.2) posteriormente se procedió a su análisis.

## Resultados y discusión

*Spiroplasma kunkelii* estuvo presente en adultos de *D. maidis* colectados sobre maíz de riego en Colima y El Grullo durante la estación seca (noviembre a mayo) del primer (2000-2001) y segundo (2003-2004) año del estudio (Cuadros 1 y 2). Sin embargo, durante la estación seca de los dos años del estudio, no se encontró la presencia de la bacteria en adultos de *D. maidis* colectados en pastos que crecieron en lo que fue maíz de temporal, en las localidades de Sayula y Zapopan. Lo anterior se debe posiblemente a que pocos adultos fueron encontrados o procesados con PCR para detectar la presencia de *S. kunkelii*. Recientemente Summers *et al.* (2004) encontraron la presencia de *S. kunkelii* no solo en chicharritas del maíz, como reportado en este estudio, sino también en plantas de maíz que crecen durante la estación seca en el Valle de San Joaquín en California. Debido a que *D. maidis* se alimenta de su planta hospedera primaria, el maíz (*Zea mays*) durante la estación seca, los hábitats de California y maíz cultivado bajo irrigación en México son análogos. Por lo tanto, los datos reportados en este trabajo y los reportados en California sostienen la hipótesis de que la bacteria pasa la estación seca localmente en hábitats donde existe maíz, y dentro de su insecto vector la chicharrita del maíz.

*Spiroplasma kunkelii* estuvo presente en adultos colectados en maíz en estado de senectud (octubre) y en maíz en estado de plántula (mayo y junio). Lo anterior fue encontrado en los dos tipos de hábitat. En el primer año de estudio *S. kunkelii* estuvo presente en 8% de las chicharritas en maíz de riego (Colima), que fueron colectadas en octubre y mayo (Cuadro 1). Mientras que en el segundo año del estudio *S. kunkelii* fue detectada positivamente en 7% de las chicharritas obtenidas de maíz de temporal (Sayula) en octubre y mayo (Cuadro 2). Los datos anteriores sugieren que el número de individuos portadores de *S. kunkelii* que son emigrantes (los colectados en octubre) no cambio respecto a los individuos inmigrantes (los colectados en mayo) en los dos tipos de hábitat, debido a que el porcentaje de adultos emigrantes e inmigrantes con presencia de *S. kunkelii* fue similar.

El máximo porcentaje de *D. maidis* con presencia de *S. kunkelii* fue encontrado en altitudes bajas durante los dos años del estudio. En Coquimatlan, Colima (495 m) el máximo porcentaje de individuos infectados fue de 20%, en Ayuquila, El Grullo (880 m) fue de 40%, en Uxmala, Sayula (1,366 m) fue de 7%, mientras que en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Zapopan (1,570 m) nunca fue detectada la presencia de *S. kunkelii* en las chicharritas procesadas. Estos resultados confirman que la distribución de *S. kunkelii* en los trópicos es principalmente en bajas altitudes, que van desde en nivel del mar hasta los 1,000 metros de altitud y es donde

ocurren las mayores pérdidas de maíz (*Zea mays*) por efecto de *S. kunkelii* (Barnes 1954; Davis 1973, 1977; Nault 1983).

**Cuadro 1.** Identificación de *S. kunkelii* con PCR en adultos de *D. maidis* colectados en dos tipos de hábitat (maíz de riego y de secano) de octubre (2000) a junio (2001) en el centro de México. n = número total de chicharritas procesadas con la técnica de PCR, (+) = número de chicharritas con la bacteria, (%) = porcentaje de chicharritas con presencia de la bacteria, \* = adultos no colectados, no procesados, o sin muestreo.

Localidad (hábitat)	2000			2001				
	E s t a c i ó n			S e c a				
	oct n (+) (%)	nov n (+) (%)	dic n (+) (%)	ene n (+) (%)	feb n (+) (%)	abr n (+) (%)	may n (+) (%)	jun n (+) (%)
Colima (riego)	100 (8) 8.0	15 (3) 20.0	21 (0) 0.0	21 (2) 9.5	12 (0) 0.0	26 (1) 4.0	100 (8) 8.0	15 (0) 0.0
El Grullo (riego)	15 (0) 0.0	*	*	*	*	*	30 (0) 0.0	15 (0) 0.0
Sayula (secano)	15 (0) 0.0	15 (0) 0.0	*	*	*	*	8 (0) 0.0	7 (0) 0.0
Zapopan (secano)	15 (0) 0.0	*	*	*	*	*	13 (0) 0.0	15 (0) 0.0

**Cuadro 2.** Identificación de *S. kunkelii* con PCR en adultos de *D. maidis* colectados en dos tipos de hábitat (maíz de riego y de seco) de octubre (2003) a junio (2004) en el centro de México. n = número total de chicharritas procesadas con la técnica de PCR, (+) = número de chicharritas con la bacteria, (%) = porcentaje de chicharritas con presencia de la bacteria, \* = adultos no colectados, no procesados, o sin muestreo.

Localidad (hábitat)	2003			2004				
	oct n (+) (%)	E s t a c i ó n		S e c a				
		nov n (+) (%)	dic n (+) (%)	ene n (+) (%)	feb n (+) (%)	abr n (+) (%)	may n (+) (%)	jun n (+) (%)
Colima (riego)	100 (6) 6.0	*	*	100 (0) 0.0	15 (0) 0.0	15 (0) 0.0	15 (0) 0.0	15 (0) 0.0
El Grullo (riego)	15 (0) 0.0	15 (0) 0.0	15(6) 40.0	15 (0) 0.0	15 (0) 0.0	*	15 (0) 0.0	15 (0) 0.0
Sayula (secano)	15 (1) 6.6	*	*	*	*	*	15 (1) 6.6	*
Zapopan (secano)	15 (0) 0.0	15(0) 0.0	*	*	*	*	*	*

**Literatura citada**

- Aljanabi** SM and Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR –based techniques. *Nucleic Acids Research* **25**: 4692-4693.
- Barnes** D. 1954. Biología, ecología y distribución de las chicharritas, *Dalbulus elimatus* (Ball) y *Dalbulus maidis* (DeL. & W.). *Folleto Técnico* número **11**. Secretaria de Agricultura y Ganadería, Oficina de Estudios Especiales, México, Distrito Federal.
- Barros** TSL, Davis RE, Resende RO and Dally EL. 2001. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. *Plant Disease* **85**: 475-480.
- Davis** RE. 1973. Occurrence of a spiroplasma in corn stunt infected plants in Mexico. *Plant Disease Reporter* **57**: 333-337.
- Davis** RE. 1977. Spiroplasma: Role in the diagnosis of corn stunt disease. pp 92-98. In: Williams LE, Gordon DT and Nault LR (eds.), *Proceedings Maize Virus Disease Colloquium and Workshop*. Ohio Agricultural Research and Development Center, Wooster, Ohio, USA.
- Ebbert** MA and Nault LR. 1994. Improved Overwintering Ability in *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) Vectors Infected with *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae). *Environmental Entomology* **23**: 634-644.
- Ebbert** MA and Nault LR. 2001. Survival in *Dalbulus* leafhoppers improves after exposure to maize stunting pathogens. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **100**: 311-324.
- Larsen** KJ, Nault LR and Moya-Raygoza G. 1992. Overwintering Biology of *Dalbulus* Leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae): Adult Population and Drought Hardiness. *Environmental Entomology* **21**: 566-577.
- Larsen** KJ, Lee Jr. RE and Nault LR. 1993. Influence of developmental conditions on cold-hardiness of adult *Dalbulus* leafhoppers: implications for overwintering. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **67**: 99-108.
- Moya-Raygoza** G, Nault LR, Hogenhout SA y Styer WE. 2002. Variación en la transmisión del espiroplasma *Spiroplasma kunkelii* por poblaciones de la chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae). *Folia Entomológica Mexicana* **41**: 113-118.
- Nault** LR. 1983. Origins in Mesoamerica of maize viruses and mycoplasmas and their leafhopper vectors, pp 259-266. In: R.T. Plumb and J.M. Thresh (eds.), *Plant Virus Epidemiology: The Spread and Control of Insect-Borne Viruses*. Blackwell, Oxford, England.
- Nault** LR and Ammar DE. 1989. Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annual Review of Entomology* **34**: 503-529.
- Nault** LR. 1990. Evolution of an insect pest: maize and the corn leafhopper, a case study. *Maydica* **35**: 165-175.
- Summers** CG, Newton AS and Opgenorth DC. 2004. Overwintering of Corn Leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae), and *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) in California's San Joaquin Valley. *Environmental Entomology* **33**: 1644-1651.
- Triplehorn** BW and Nault LR. 1985. Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the Macrostelini. *Annals of Entomological Society of America* **78**: 291-315.