

Detección y Evaluación del Fitoplasma *Maize Bushy Stunt* en el Estado de Veracruz, México.

Detection and Evaluation of Maize Bushy Stunt Phytoplasma in the State of Veracruz, Mexico.

Susana Alcántara-Mendoza, Daniel Téliz-Ortíz, Carlos De León, Elizabeth Cárdenas-Soriano, Ana María Hernández-Anguiano, Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, Fitopatología, Texcoco, México, CP 56230, **Dimas Mejía-Sánchez,** Universidad Autónoma Chapingo, Instituto de Parasitología, Chapingo, México, CP 56230, **Rodolfo De La Torre-Almaraz,** Universidad Nacional Autónoma de México, UBIPRO FES-Iztacala, Tlalnepantla, México CP 54090. Correspondencia: dteliz@colpos.mx

(Recibido: Julio 29, 2009 Aceptado: Mayo 14, 2010)

Alcántara-Mendoza, S., Téliz-Ortíz, D., De León, C., Cárdenas-Soriano, E., Hernández-Anguiano, A. M. 2010. Detección y evaluación del fitoplasma *Maize bushy stunt* en el estado de Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 34-43.

Alcántara-Mendoza, S., Téliz-Ortíz, D., De León, C., Cárdenas-Soriano, E., Hernández-Anguiano, A. M. 2010. Detection and evaluation of *Maize bushy stunt* phytoplasma in the state of Veracruz, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 34-43.

Resumen. Una enfermedad del maíz de etiología desconocida apareció epidémicamente en el estado de Veracruz, México durante 2003-2004. Las plantas enfermas se caracterizaron por muerte prematura de plantas, producción múltiple de jilotes estériles, pudrición vascular, hojas con manchas blancas, amarillamiento, enrojecimiento y franjeado foliar y necrosis. El fitoplasma *Maize bushy stunt* (MBS) se detectó por PCR asociado a plantas con amarillamiento, enrojecimiento foliar y proliferación de jilotes en los municipios de Tlalixcoyan, Cosoleacaque y Paso de Ovejas en 2006 y 2007. La incidencia, severidad y rendimiento se evaluaron en diez genotipos de maíz en una plantación experimental en Tlalixcoyan, Ver. en 2007. MBS se detectó por PCR en CP-562, 30F83, 30F92, Orca, 30F96, Nutria y Asgrow 7573, mientras que Pioneer 3086, 30F97 y CP-560 resultaron negativos. 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 de grano fueron AS-7573 (5.4 ton ha⁻¹), Orca (4.7 ton ha⁻¹) y 30F97 (4.0 ton ha⁻¹). Hubo correlación positiva de la incidencia con la severidad de la enfermedad ($r=0.69^{**}$), pero no de la enfermedad con el rendimiento.

Abstract. A maize disease of unknown etiology appeared in the state of Veracruz, Mexico, during 2003-2004. Diseased plants were characterized by premature death, proliferation and poor ear growth, sterility in both male and female flowers, stalk rot, leaves with white spots, yellowing and reddening on leaf margins, leaf stripes, and necrosis. *Maize Bushy Stunt* (MBS) phytoplasma was PCR detected and associated with plants with yellow and red leaves and ear proliferation in Tlalixcoyan, Cosoleacaque and Paso de Ovejas counties in 2006 and 2007. Ten maize genotypes were evaluated for incidence and severity of the disease and grain yield performance in an experimental plot in Tlalixcoyan, Ver. in 2007. MBS was PCR detected in CP-562, 30F83, 30F92, Orca, 30F96, Nutria and Asgrow 7573; whereas Pioneer 3086, 30F97 y CP-560 were MBS negative. Highest incidence and severity was detected in 30F83 (27 %, 0.29), AS-7573 (21 %, 0.14) and 30F97 (21 %, 0.15). Best grain yield was produced by AS-7573 (5.4 ton ha⁻¹), Orca (4.7 ton ha⁻¹), and 30F97 (4 ton 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 grain ($r=0.51^{**}$). There was no correlation between disease and yield.

Palabras clave adicionales: Maíz, rendimiento, incidencia, severidad, PCR

Additional Keywords: Maize, yield, incidence, severity, PCR.

En 2003-2004 apareció una enfermedad de etiología desconocida en plantaciones de maíz Asgrow 7573 en los municipios de Tlalixcoyan, Cosoleacaque, Piedras Negras y Paso de Ovejas, Veracruz, que causó la muerte prematura de plantas de maíz en etapa reproductiva R₂ (Ritchie y Hanway, 1982). La enfermedad se caracterizó por síntomas de amarillamiento, enrojecimiento y secado de hojas, secado de la planta, producción múltiple de jilotes raquíuticos, falta de fecundación y granos vanos, pudrición vascular en el tallo, franjeado foliar, necrosis en la nervadura central, necrosis en la vaina de la hoja, manchas blanco-amarillentas en las brácteas y deformación del jilote. El síntoma de amarillamiento comenzó en el margen de las hojas inferiores y avanzó hacia las superiores. El margen de las hojas se enrojeció tomando después un color púrpura. Las plantas presentaron achaparramiento, producción múltiple de jilotes con deficiente o nula fecundación y mazorcas con deficiente desarrollo de granos. Las hojas se secaron de la punta a la base y la planta de maíz se secó de la base hacia el ápice. Los síntomas iniciaron en la etapa vegetativa V₁ (Ritchie y Hanway, 1982) y terminaron con deshidratación total de la planta en la etapa reproductiva R₂ (Ritchie y Hanway, 1982). Todas las plantas sintomáticas murieron sin llegar a la madurez fisiológica. Gijón *et al.*, 2008 detectaron la presencia de bacterias en plantas sintomáticas e identificaron a *Burkholderia gladioli* asociada a los síntomas de las manchas pequeñas, blanco amarillentas que se fusionaron en franjas secas necróticas, a la pudrición y necrosis de la base de la hoja bandera, enrollamiento hacia el haz y desecación, presencia ocasional de enrojecimiento, pudrición en la corona de los tallos y al achaparramiento de la planta. Los síntomas de enrojecimiento foliar y producción múltiple de jilotes que se encontraron como parte del síndrome, son similares a los ocasionados por el fitoplasma *Maize bushy stunt* (MBS). 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 granos reducidos y plantas con poco sistema radical (CIMMYT, 2004; Nault, 1998; Madden y Nault, 1983). El *Maize bushy stunt* es el causante de la enfermedad del enanismo arbustivo del maíz. Sin embargo, el nombre de achaparramiento del maíz se utiliza en México para referirse a un complejo causado por la acción combinada del fitoplasma *Maize bushy stunt* (MBS), *Spiroplasma kunkelli* (CSS) y el virus rayado fino del maíz (MRFV). El achaparramiento del maíz se reportó inicialmente en California y Texas (Alstatt, 1945). Maramorosh (1955), reportó como agentes causales del achaparramiento del maíz a dos razas del virus, a las que denominó raza Rio Grande y Mesa Central. Davis y Worley reportaron en 1973 la presencia de espiroplasmas en plantas de maíz con achaparramiento tipo Rio grande. Nault (1980) reportó que los síntomas del fitoplasma MBS son idénticos a los de la enfermedad conocida como Mesa Central y Louisiana y en 1981 Bascopé y Galindo determinaron que los dos tipos de achaparramiento en maíz eran causados por diferentes patógenos, uno por espiroplasmas y otro por organismos parecidos a

A disease of unknown etiology appeared in 7573 Asgrow maize plantations at the Tlalixcoyan, Cosoleacaque, Piedras Negras and Paso de Ovejas counties in the state of Veracruz, Mexico in 2003-2004, which caused premature death of maize plants in reproductive stage R₂ (Ritchie and Hanway, 1982). The disease was characterized by yellowing, redness and drying of leaves, drying of the plant, multiple production of stunted jilotes, lack of fertilization and vain grains, vascular stem rot, stripped leaf, midrib necrosis, yellowish-white spots on the bracts and jilote deformation. The yellowing symptoms began by the margin of the lower leaves and moved upwards. The leaves margin turned red taking a purple color, afterwards. Stunting, production of multiple jilotes with a poor or no fertilization and ears with poor grain development were additional symptoms. The leaves dried off from the tip to the base and the corn plant dried from base to apex. The symptoms began in the vegetative stage V_t (Ritchie and Hanway, 1982) and ended with the plant complete dehydration in its reproductive stage R₂ (Ritchie and Hanway, 1982). All plants died before physiological maturity. Bacteria in symptomatic plants was detected by Gijón *et al.*, (2008), who associated *Burkholderia gladioli* with small white-yellowish spots which merged into dry necrotic leaf stripes, rot and necrosis at the base of the flag leaf, wich rolled inwards and dried out, occasional redness presence; stem crown rot and plant stunting. Symptoms of red leaf and production of multiple ears are similar to those caused by the MBS phytoplasma. MBS symptoms include chlorosis on leaf margins, redness at the tips of older leaves, proliferation of axillary and basal shoots, ears with diameter and grain size reduced or sterile ears and plants with little radical system (CIMMYT, 2004; Nault, 1998; Madden and Nault, 1983). Corn stunt is used in Mexico to refer to a complex disease caused by the combined action of *Maize bushy stunt* (MBS) phytoplasma, *Spiroplasma kunkelli* (CSS) and the maize rayado fino virus (MRFV). Corn stunt was first reported in California and Texas (Alstatt, 1945). Two races of the virus were reported by Maramorosh (1955) as the causal agents, which he called Rio Grande and Mesa Central races. The presence of spiroplasmas in maize plants with Rio Grande stunting type was reported by Davis and Worley in 1973. Nault (1980) reported that MBS phytoplasma symptoms are identical to those known as Mesa Central and Louisiana; Bascopé and Galindo in 1981 determined that both of the corn stunt types were caused by different pathogens, one by spiroplasmas and the other by mycoplasma-like organisms. The corn stunt disease has been visually identified and reported in Veracruz (Sierra *et al.*, 2007) and associated with MBS in Tlaltizapan, Mor. and Texcoco, Mex. by Harrison *et al.*, (1996). The study hereby focused on determining the role of MBS in the disease syndrome, and to evaluate the effect of the incidence and severity of the disease on yield of maize different genotypes.

MATERIALS AND METHODS

Detection of MBS phytoplasma.

Collection of plant material. Twenty plots were randomly selected to be sampled in each of Cosoleacaque, Tlalixcoyan

micoplasmas. La enfermedad del achaparramiento del maíz se ha registrado en Veracruz (Sierra *et al.*, 2007) y asociada con el MBS en Tlaltizapan, Mor. y Texcoco, Méx. por Harrison, *et al.* (1996). Por la semejanza de algunos de los síntomas de esta enfermedad con los del fitoplasma MBS, la presente investigación se concentró en determinar la presencia del MBS como agente involucrado en la enfermedad que causó muerte prematura de plantas de maíz en Veracruz en 2003-04 y en evaluar la incidencia y severidad del MBS con el rendimiento de diferentes genotipos de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección del fitoplasma MBS.

Colecta de material vegetal. Se recorrieron las áreas maiceras de los municipios de Cosoleacaque, Tlalixcoyan y Paso de Ovejas, Veracruz; en cada municipio se muestrearon 20 parcelas y solo se registró la ubicación geográfica de aquellas con presencia del síndrome, mediante un GPS38 personal navigator. Las muestras en cada parcela se colectaron en diferentes ciclos de cultivo durante 2006 y 2007 (Cuadro 1) en etapa vegetativa V_i (Ritchie y Hanway, 1982) del maíz, en siembras del cultivar de maíz elotero Asgrow 7573, el único que se siembra en la región muestreada. El muestreo de cada lote fue sistemático (Campbell y Madden, 1990; Guigón y González, 2001) y se realizó siguiendo un patrón de muestreo en W, considerando 10 puntos de muestreo, en cada uno de los cuales se tomaron muestras compuestas de hojas y raíces adventicias de plantas con presencia de la enfermedad. La muestra compuesta consistió de tres plantas con uno o más síntomas de enrojecimiento en el margen de las hojas, amarillamiento y producción múltiple de jilotes. El total de muestras compuestas por parcela fueron 10. Las muestras se colectaron en bolsas de plástico, se etiquetaron y se transportaron en una hielera para procesarse en laboratorio.

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 tierra y se enjuagaron con agua destilada estéril. El tejido vegetal se colocó en un mortero estéril y se congeló a -70°C por 5 h. El tejido congelado se trituró y 0.01 g se transfirieron de un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se adicionaron 300 µl del reactivo Plant DNA-Zol®. La suspensión se incubó por 5 min. a temperatura ambiente en agitación. La suspensión se mezcló con 300 µl de cloroformo y se agitó por 20 segundos. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. en agitación y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml y se adicionaron 250 µl de etanol absoluto frío (-8°C). Se mezcló por inversión de 6 a 8 veces y se incubó por 5 min. a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 6500 rpm por 7 min. y se tiró el sobrenadante. La pastilla se lavó adicionando 300 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 6500 rpm por 5 min. 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%. La electroforesis se realizó con tinción en Bromuro de etidio

and Paso de Ovejas counties in the state of Veracruz. Asgrow 7573 was the unique maize variety planted in the sampled region. The geographical location of sampled plots was registered by a GPS38 personal navigator. Samples were collected in 2006 and 2007 growing seasons (Table 1) at corn vegetative stage V_t (Ritchie and Hanway, 1982). Ten leaf and root samples were collected from each plot following a W sampling pattern (Campbell and Madden, 1990; Guigón and González, 2001); Each sample consisted of three plants with one or more symptoms of redness and yellowing on the leaves margin and ear proliferation. Samples were collected in plastic bags, labeled and transported in an ice cooler to a laboratory.

Nucleic acid extraction. DNA was extracted from leaves and roots by the Plant DNA-Zol® method. Roots were washed under running water to remove dirt and rinsed with sterile distilled water. The plant tissue was placed in a sterile mortar and frozen at -70°C for 5 h. The frozen tissue was grounded and 0.01 g was transferred to a 1.5 ml Eppendorf tube. A total of 300 µl of the Plant DNA-Zol® reactive were added. The suspension was incubated for 5 min., stirred at room temperature and centrifuged at 12000 rpm for 10 min. The supernatant was transferred to a 1.5 ml Eppendorf tube and 250 µl of absolute cold ethanol (-8°C) were added. It was mixed by inverting 6 to 8 times and incubated for 5 min. at room temperature. The mixture was centrifuged at 6500 rpm for 7 min. and the supernatant was thrown away. The pellet was washed by adding 300 µl of 75 % ethanol and centrifuged at 6500 rpm for 5 min. The supernatant was removed and the pellet was re-suspended in 50 µl of sterile deionized water DNase and RNase free (Gibco). The DNA quality was determined by electrophoresis in an agarose gel at 1 %. The electrophoresis was performed with ethidium bromide staining at a 2 x 10⁻⁴ µl ml rate, with a 45 min. running time at 80 volts. The DNA obtained was stored at 4°C until use.

Conditions of the polymerase chain reaction (PCR). The primers used for the DNA amplification of MBS by PCR were MBSF1 (5'-AA TGT CGA ACT AAC AGG CCG-3') and MBSR1 (3'-GGT TTT GGT TTA GCG GTT-5') (Barros, *et al.*, 2001), which consisted of a genomic DNA partial sequence of MBS phytoplasma to obtain a synthetic DNA product with 740 bp. The PCR reaction final mixture (50 µL total volume) consisted of 2.5 mM MgCl₂, PCR Buffer reaction 1X, 200 mM of dNTP mixture, 0.2 mM of each primer, 2.5 Taq DNA polymerase units and 2 µL of DNA (20-200 ng/µL). The PCR amplification was performed in a Bio Rad® thermocycler with 94°C initial denaturation temperature for 1 min., 35 denaturation temperature cycles at 94°C for 1 min., annealing at 57°C for 2 min., primer extension at 72°C for 3 min. and a final 7 min. cycle. The PCR products (10 µl) were analyzed by agarose gel electrophoresis at 1.5 %. The electrophoresis was performed with ethidium bromide staining at a 2 x 10⁻⁴ µl ml proportion, with a 45 min. running time at 80 volts. The agarose gel was photo-documented. The positive control consisted of a DNA sample of the MBS phytoplasma, donated by Robert Davis, from the USDA, Beltsville that amplifies a 740 bp band with the MBSF1 and MBSR1 primers (Barros *et al.*, 2001).

en proporción de 2×10^{-4} µl/ml, con un tiempo de corrida de 45 min. a 80 volts. El DNA obtenido se almacenó a 4°C hasta su uso.

Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los iniciadores que se usaron para la amplificación de DNA del MBS mediante PCR 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 DNA genómico del fitoplasma MBS para obtener un producto del DNA sintético con 740 pb. La mezcla final de reacción del PCR (50 µL volumen total) consistió en 2.5 mM MgCl₂, Buffer de reacción de PCR 1X, 200 mM de mezcla de dNTP's, 0.2 mM de cada iniciador, 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa, y 2 µL de DNA (20-200 ng/µL). La amplificación de PCR fue llevada a cabo en un termociclador automático (Bio Rad®) con temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 1 min., 35 ciclos de temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 min, anillamiento a 57°C por 2 min, extensión del iniciador a 72°C por 3 min. y 7 min. en el ciclo final. Los productos de PCR (10 µl) fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. La electroforesis se realizó con tinción en Bromuro de etidio en proporción de 2×10^{-4} µl/ml, con un tiempo de corrida de 45 min. a 80 volts. El gel de agarosa se fotodocumentó después de la electroforesis. El testigo positivo consistió de una muestra de DNA del fitoplasma MBS, donada por el Dr. Robert Davis de USDA, Beltsville que amplifica una banda de 740 pb con los iniciadores MBSF1 y MBSR1 (Barros, *et al.*, 2001). El testigo negativo fue agua destilada estéril libre de DNAsas y DNAsas.

Secuenciación de nucleótidos. El producto de PCR se purificó con kit Wizard® SV. El protocolo de purificación fue el indicado en el kit Wizard® SV que pertenece a la compañía comercial Promega Corporation, USA. El fragmento fue secuenciado en el Instituto de Fisiología celular de la Universidad Autónoma de México, en un secuenciador automático de DNA (Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystem Corp). La secuencia obtenida se alineó 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).

Efecto de la incidencia y severidad en el rendimiento. La incidencia de la enfermedad y el rendimiento se estudió entre Abril y Agosto de 2007 en una parcela experimental que se estableció en Tlalixcoyan, Ver. La parcela experimental se ubicó a 18.7 latitud Norte y 96.1 longitud Oeste. El clima de la región es cálido subhúmedo con lluvias en verano, Aw2 (w) (i')gw". La preparación del área de siembra se realizó por medio de chapeo, un paso de arado, y un paso de rastra para realizar la siembra. La parcela experimental se estableció con 10 genotipos de maíz: CP-562, 30F83, 30F92, Orca, 30F96, Nutria, Asgrow 7573, Pioneer 3086, 30F97 y CP-560. La siembra se realizó en la segunda semana de Abril de 2007. El diseño experimental fue en bloques al azar con cuatro repeticiones en surcos de 5 m. de largo y 0.8 m. entre surcos, con una densidad de población de 5 plantas por metro cuadrado que equivale a 50, 000 plantas por ha⁻¹. Cada repetición consistió de 8 m² por repetición y una superficie

The negative control was sterile distilled water RNase and DNase free.

Nucleotide sequencing. The PCR product was purified with the Wizard® SV kit. The purification protocol was described in the Wizard® SV kit, (Promega Corporation, USA). The fragment was sequenced at the Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México in a DNA automatic sequencer (Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystem Corp). The sequence obtained was aligned with the sequences available at the GenBank database using the BLAST method NCBI, 2007. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, consult April 2008).

Effect of MBS incidence and severity on yield. Disease incidence and yield were evaluated between April and August, 2007 at an experimental plot established in Tlalixcoyan, Ver., (18.7 N and 96.1 W). The climate of the region is hot and sub-humid with summer rains, Aw2 (w) (i')gw. The experimental plot was established in the second week of April, 2007 with 10 maize genotypes: CP-562, 30F83, 30F92, Orca, 30F96, Otter, Asgrow 7573, Pioneer 3086, 30F97 and CP-560. The experimental design was randomized blocks with four replications in rows of 5 m long and 0.8 m among rows, with a population density of 5 plants per square meter, (50,000 plants per ha⁻¹). Each replication of 8 m² and a total experimental area of 368 m². Weeds were manually controlled 35 days after sowing. Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) was controlled with Lorsban® 480 EM (0.75 ml per liter) 30 days after sowing. Plots were fertilized 25 and 45 days after sowing with granulated 17-17-17 of N, P and K. Minor elements were complemented with biweekly applications of foliar Bayfolan (1 ml per liter) for a month, starting 45 days after planting. MBS disease was measured by incidence and severity parameters. Disease incidence (number of diseased plants in vegetative stage V (Ritchie and Hanway, 1982) related with total plants per hectare was evaluated 72 days after planting in the experimental plot. Presence of MBS phytoplasma was PCR confirmed from all symptomatic plants, following the previously described protocol. Levels of severity were based on an arbitrary scale with six classes: 0: Asymptomatic plant; 1: Normal height plant with red leaf margins; 2: Dwarf plant with red leaf margins; 3: Normal height plant with ear proliferation; 4: Dwarf plant with ear proliferation; 5: Normal height plant with red leaf margins and ear proliferation; 6: Dwarf plant with red leaf margins and ear proliferation. Disease severity (sum of severity level of all symptomatic plants divided by the total of diseased plants) was evaluated in each genotype. Yield parameters measured were: Yield (RTO) = ears weight (ton/ha) measured with a hanging Torino scale, model AC-10; Grain weight (PSEM) = Grain weight (ton/ha) measured with an Ohaus scale, Scout Pro Sp6000; Grain weight from diseased ears (PESENF) ton/ha; Weight difference (DIFPES) = Weight of healthy ears minus weight of diseased ears related (%) with weight of healthy ears; Yield reduction (DISREND) = Weight of diseased grains related (%) with weight of healthy grain; Diseased ears (MAZENF) = Number of diseased ears (rot, with nil growth, with poor or vain grains) per experimental unit and per ha.

total del experimento de 368 m. El control de malezas y aporque se realizó de forma manual a los 35 días después de la siembra. A los 30 días después de la siembra se aplicó Lorsban* 480 EM con dosis de 0.75 ml por litro para el control de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). La fertilización se realizó con dos aplicaciones del fertilizante granulado tripe 17 (17 - 17 - 17 de N, P y K, respectivamente). Se realizaron dos fertilizaciones: la primera a los 25 días después de la siembra y la segunda a los 45 días después de la siembra. La fertilización se complementó con aplicaciones foliares de Bayfolán en dosis de 1 ml por litro, a partir de los 45 días después de la siembra con dos aplicaciones semanales durante un mes. Las variables relacionadas con la enfermedad fueron la Incidencia y la Severidad. Incidencia (INC)= es el número de plantas enfermas en etapa vegetativa V_i (Ritchie y Hanway, 1982), con respecto al total de plantas por hectárea. La incidencia se evaluó a los 72 días después de la siembra en todas las plantas de toda a parcela experimental. La presencia del fitoplasma MBS en las plantas con incidencia de la enfermedad se corroboró mediante detección molecular. Se colectaron muestras de tres plantas con incidencia de la enfermedad por parcela útil y se trasladaron al laboratorio para su análisis. El transporte, la extracción de ácidos nucleídos y las condiciones de detección mediante la amplificación por PCR, fueron las mismas que se utilizaron en la detección del MBS en tres municipios de Veracruz y se explico con anterioridad. Severidad (SEVER)= suma del grado de severidad todas cada planta con síntomas dividido entre el número de plantas enfermas. La severidad se evaluó en todas las plantas de cada repetición por genotipo, en toda la parcela experimental. El grado de severidad de cada planta se midió utilizando una escala visual arbitraria con seis clases, 0: Planta sana, 1: Planta de altura normal con hojas de bordes enrojecidos, 2: Planta achaparrada con hojas de bordes enrojecidos, 3: Plantas de altura normal con producción múltiple de mazorca, 4: Planta achaparrada con producción múltiple de mazorca, 5: Plantas de altura normal con hojas de bordes enrojecidos y producción múltiple de mazorca y 6: Planta achaparrada con hojas de bordes enrojecidos y producción múltiple de mazorca. Las variables de medición relacionadas con el rendimiento fueron: Rendimiento (RTO)= Peso de mazorcas en toneladas por hectárea. Peso de grano (PSEM)= Peso total de grano en toneladas por hectárea, Peso de grano de mazorcas enfermas (PESENF)= peso de grano en toneladas por hectárea de mazorcas enfermas, Diferencia de peso (DIFPES)= peso de mazorcas sanas menos peso de mazorcas enfermas por hectárea con respecto al peso de mazorcas sanas expresado en porcentaje, Disminución de rendimiento (DISREND)= Peso de grano enfermo con respecto al peso de grano sano expresado en porcentaje. El peso de mazorcas y de grano (sana o enferma o de ambas), se calculó al multiplicar el peso de las mazorcas cosechadas o el peso del grano en la parcela útil, por su respectivo factor de superficie y ajustar al 15% de humedad (Mejía y Molina 1999). El peso de las mazorcas se midió con una báscula colgante Torino, modelo AC-10 y el peso de grano cosechado por parcela útil se midió con una balanza marca Ohaus modelo Scout Pro SP6000 con precisión de ± 1 g.

Weight of ears and grains (healthy or diseased) was calculated by multiplying the weight from the experimental unit by the area factor and adjusted to 15% humidity (Mejía y Molina, 1999). Disease and yield parameters were measured in the same experimental plot and all plants of the experimental unit were analyzed with SAS 1999. Media were compared by Tukey with $\alpha \leq 0.01$. Correlations were calculated with SAS CORR.

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular detection and symptoms associated to MBS phytoplasma. A fragment of 740 bp was obtained with MBSF1 y MBSR1 primers which correspond to MBS phytoplasma (Barros, et al., 2001) (Figure 1). MBS phytoplasma was detected in maize plants from the seven sampled plots from Cosoleacaque, the six plots from Tlalixcoyan y one sampled plot from Paso de Ovejas county (Table 1). These three counties are at sea level and their climate conditions (García, 1987) allow the growth of maize throughout the year. MBS disease becomes endemic (Hruska, et al. 2006), therefore it might be a permanent disease in these counties (Table 1). Sampled plants from Cosoleacaque had yellow and red leaves; those from Tlalixcoyan had yellow leaves with red margins, thin stems and ear proliferation; plants sampled in Paso de Ovejas county had yellow leaves with red margins, and ear proliferation.

Nucleotide sequence. The sequence obtained with the specific primers was deposited in the Genbank with the access number EU840177 and had a 99% de homology with the partial sequence which codes the gene responsible of production of Zn ATP-dependent protease and with the sequence of the hypothetic protein (pam562) of MBS phytoplasma with 0% error from 734 scores comparing with sequences deposited in the Genbank.

Disease incidence and effect on yield. MBS phytoplasma incidence in the experimental plot at Tlalixcoyan county was verified by molecular tests (Figure 2). CP-562, 30F83, 30F92, Orca, 30F96, Nutria y Asgrow 7573 genotypes showed leaf yellowing with red margins, ear and axillary buds proliferation, and thin stems; all were positive to MBS PCR detection. Pioneer 3086, 30F97 y CP-560 were MBS negative, despite showing leaves with red margins. PCR tests were repeated several times with different DNA concentrations and including nested PCR; the positive control amplified in all repetitions. These foliar symptoms in the MBS negative cultivars could be caused by other pathogens, like Burkholderia gladioli who was detected in plants with similar symptoms from the same regions (Gijón et al. 2008). In general ear yields varied between 4 - 6 ton ha⁻¹ and grain yields between 3 - 5 ton ha⁻¹. Incidence varied between 10 - 27% and severity from 0.05 - 0.3%. Orca, AS-7573 y 39F97 were significantly superior in ear and grain yields. Orca high yield (6.1 ton ha⁻¹) probably is related with low disease severity (0.14) and low incidence (11%) (Table 2). This disease was originally observed in 2003-2004 in high incidences in comercial plantings with AS-7573 maize genotype. In this work AS-7573 had a high MBS incidence (18.09), a high severity (0.25) and a high number of diseased

Mazorcas enfermas (MAZENF)= número de mazorcas enfermas por hectárea. Las mazorcas enfermas se evaluaron contando el número de piezas de mazorcas podridas, sin desarrollar, con deficiencia de grano y granos vanos por parcela útil y se calculó por hectárea. Las variables de la enfermedad y del rendimiento fueron tomadas de la misma parcela experimental y se analizaron todas las plantas de toda la parcela útil. Los datos se analizaron con el paquete estadístico Statistical Analysis System SAS, 1999, de acuerdo al diseño experimental. La comparación de medias de las variables se efectuó mediante la prueba de Tukey con un $\alpha \leq 0.01$. Las variables de enfermedad y rendimiento se correlacionaron para observar si existe efecto entre variables con el procedimiento CORR de SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección molecular de fitoplasmas y síntomas asociados a MBS. El resultado de la detección molecular fue un fragmento de 740 pb con los primers MBSF1 y MBSR1 que corresponde al fitoplasma MBS (Barros, *et al.*, 2001) (Figura 1).

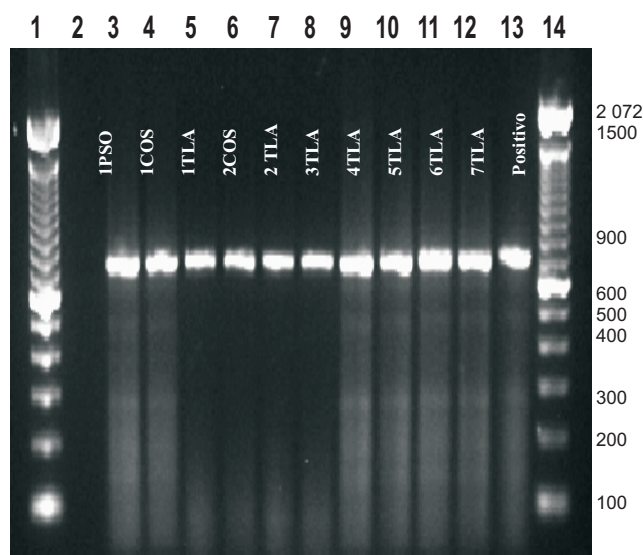


Figura 1. Amplificación de la secuencia 16S DNAr de fitoplasmas con el par de iniciadores específicos MBSR1/MBSF1. 1: marcador Invitrogen de 100 pb, 2: muestra negativa de agua, 3-12: muestras de maíz positivas de Cosoleacaque, Tlalixcoyan y Paso de Ovejas, 13: muestra testigo positiva de maíz infectada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

Figure 1. Amplification of 16S DNAr sequence with the specific primers MBSR1/MBSF1. 1: 100bp Invitrogen marker; 2: negative control, water; 3: 12 positive maize samples from the Cosoleacaque, Tlalixcoyan and Paso de Ovejas counties; 13: MBS positive control (USDA); 14: 100 bp Invitrogen marker.

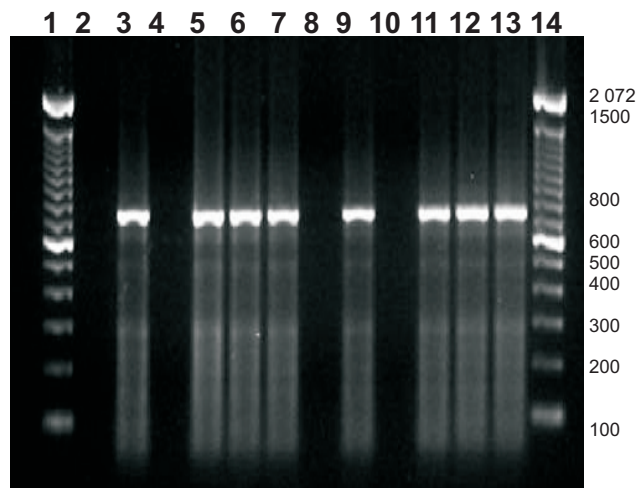


Figura 2. Detección del fitoplasma *Maize bushy stunt* en 10 genotipos de maíz (*Zea mays*) en Veracruz. 1: marcador Invitrogen de 100 pb, 2: negativo con agua, 3: positivo CP-562, 4: negativo Pioneer-3086, 5: positivo 30F83, 6: positivo 30F92, 7: positivo Orca, 8: negativo 30F97, 9: positivo 30F96, 10: negativo CP-560, 11: positivo Nutria, 12: positivo Asgrow 7573, 13: control positivo del MBS (USDA), 14: marcador Invitrogen de 100 pb.

Figure 2. Detection of *Maize bushy stunt* phytoplasma in 10 maize genotypes (*Zea mays*) in the state of Veracruz. 1: 100 bp Invitrogen marker; 2: negative control water; 3: positive CP-562; 4: negative Pioneer 3086; 5: positive 30F83; 6: positive 30F92; 7: positive Orca; 8: negative 30F97; positive 30F96; 10: negative CP-560; 11: positive Nutria; 12: positive Asgrow 7573; 13: MBS positive control (USDA); 14: 100 bp Invitrogen marker.

ears per ha (10312.5), however its ear and grain yield was similar to Orca's (Table 2). AS-7573 high ear yield (6.4 ton ha⁻¹) in Poza Rica Veracruz was also reported by Anguiluz, 1998. This, and its precocity, might be the reason of its general preference in the sampled regions. Sierra *et al.*, (2007) reported high grain yields (4.6 ton ha⁻¹) with the maize hybrid CLQ-RCWQ10xCLQ-6315x CML-491, despite a high visual incidence (53%) of corn stunt in Tlalixcoyan county. Maize genotypes might be high yielding despite a high disease incidence, as it was found with AS-7573 in this work (Cuadro 2). Orca, Nutria and CP562 had the lowest disease incidence but Orca and Nutria were significantly superior in yield (table 2). CP562 and Pioneer 3086 had a low disease incidence (11.5% y 13.7%) and yields of 4.5 and 4.2 ton ha⁻¹; however 30F92 y CP560 had high disease incidence (18.9% and 21.3%) and yields of 4.2 and 4.1 ton ha⁻¹. The effect of the disease on yield might be influenced by the frequency of susceptible plants in certain environments, as was reported by Oliveira *et al.*, (2002) with mollicutes on several maize cultivars. Our correlation analysis indicates that the higher the disease incidence the higher number of diseased ears ($r=0.43^{**}$), the higher number of diseased grains ($r=0.51^{**}$)

La detección molecular evidenció la presencia del MBS en muestras provenientes de 7 parcelas de Cosoleacaque, 6 parcelas de Tlaxicoyan y una parcela de Paso de Ovejas (Cuadro 1).

and the lesser weight of healthy grains ($r=0.51^{**}$). The higher the severity the higher weight of diseased grains ($r=0.44^{**}$) and the higher number of diseased ears ($r=0.54^{**}$). There was not correlation between disease incidence and severity with

Cuadro 1. Incidencia del fitoplasma *Maize bushy stunt* y ubicación de las parcelas de maíz (*Zea mays*) muestreadas en tres municipios de Veracruz, México en 2006 y 2007.

Table 1. Incidence of MBS phytoplasma and location of the maize plots (*Zea mays*) sampled in three counties in the state of Veracruz, Mexico in 2006 and 2007.

Clave	Municipio	Coordenadas	Altitud (msnm)	Ciclo de muestreo
1COS	Coseleacaque	17.89274N 94.63544W	21	Primavera-Verano 07
2COS	Coseleacaque	17.89663N 94.63498W	32	Primavera-Verano 07
3COS	Coseleacaque	17.89242N 94.63241W	4	Primavera-Verano 07
4COS	Coseleacaque	17.91579N 94.62561W	11	Primavera-Verano 07
5COS	Coseleacaque	17.89521N 94.62979W	9	Invierno 06
6COS	Coseleacaque	17.89798N 94.63171W	23	Invierno 06
7COS	Coseleacaque	17.89006N 94.63934W	14	Invierno 06
1TLA	Tlaxicoyan	18.71789N 96.12835W	9	Primavera-Verano 06
2TLA	Tlaxicoyan	18.72726N 96.11682W	24	Primavera-Verano 06
3TLA	Tlaxicoyan	18.72762N 96.11543W	21	Primavera-Verano 06
4TLA	Tlaxicoyan	18.72784N 96.11473W	22	Invierno 06/07
5TLA	Tlaxicoyan	18.71771N 96.12835W	12	Invierno 06/07
6TLA	Tlaxicoyan	18.71789N 96.11365W	8.5	Invierno 06/07
1PSO	Paso de ovejas	19.11247N 96.20810W	25	Otoño-Invierno 06

Los tres municipios donde se registró la presencia enfermedad se encuentran a altitudes al nivel del mar y existen condiciones de temperatura y humedad (García, 1987) para el crecimiento del maíz todo el año. Por otro lado, la enfermedad causada por el fitoplasma MBS es endémica (Hruska, *et al.* 2006), lo que sugiere que la presencia del MBS será permanente en las zonas donde se detectó su presencia (Cuadro 1), con posibilidad de causar pérdidas variables. Las muestras que se colectaron en Cosoleacaque presentaron síntomas asociados al MBS de enrojecimiento y amarillamiento foliar, mientras que en Tlaxicoyan, los síntomas que se observaron fueron plantas con tallo delgado, amarillamiento foliar, enrojecimiento en el borde de las hojas, proliferación de jilotes y hojas en las brácteas y en Paso de Ovejas fueron plantas de maíz con amarillamiento y enrojecimiento en el margen de las hojas y proliferación de jilotes.

Secuenciación de nucleótidos. La secuencia obtenida con iniciadores específicos fue depositada en el Genbank con número de acceso EU840177 y el resultado fue de 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 realizados en la comparación de la secuencia obtenida con las secuencias depositadas en el Genbank.

Incidencia y efecto en el rendimiento. La incidencia del fitoplasma MBS en la parcela experimental de Tlaxicoyan se corroboró mediante pruebas moleculares (Figura 2). Los genotipos CP-562, 30F83, 30F92, Orca, 30F96, Nutria y Asgrow 7573 presentaron síntomas de amarillamiento foliar,

yield. Disease incidence and severity were highly correlated ($r=0.69^{**}$) which agrees with $r=0.86^{**}$ found by Sierra *et al.*, (2007) (Table 3).

CONCLUSIONS

MBS phytoplasma was PCR identified as part of the etiology of the maize disease that appeared epidemically in Veracruz in 2003-2004, associated with yellowing and reddening of leaves, ear proliferation and plant stunting.

The disease syndrome was observed in the maize var Asgrow 7573 in Tlaxicoyan, Cosoleacaque and Paso de Ovejas counties in the State of Veracruz, Mexico.

MBS was PCR detected in maize genotypes Asgrow 7573, CP-562, 30F83, 30F92, Orca, 30F96 and Nutria. This is the first report of MBS in these genotypes in Mexico.

MBS disease incidence was correlated with disease severity but did not influence maize yield.

Acknowledgments. This research was partially financed by the project SAGARPA-CONACYT 12365-2005.

tallo delgado, enrojecimiento en el borde de las hojas y producción múltiple de yemas axilares. Estos genotipos resultaron positivos a la presencia del MBS mediante detección por PCR. Los genotipos Pioneer 3086, 30F97 y CP-560 resultaron negativos a la presencia del MBS a pesar de mostrar el síntoma de enrojecimiento foliar en el borde de las hojas el cual es asociado a los síntomas causados por MBS; posiblemente estas muestras estaban infectadas con otro patógeno que causó un síntoma parecido; ya que 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. Por otro lado, Gijón *et al.*, (2008) al estudiar agentes causales del mismo síndrome que apareció en Veracruz en 2003-2004 encontró que síntomas de enrojecimiento foliar están asociados a la bacteria *Burkholderia gladioli* y determinó a dicha bacteria como uno de los agentes causales de la enfermedad en estudio. El rendimiento de mazorca osciló entre 4 y 6 ton ha⁻¹ y de 3 a 5 toneladas de grano. La incidencia varió del 10% a 27% y la severidad del 0.05 a 0.3%. ORCA, AS-7573 y 39F97 resultaron superiores y significativos en peso de mazorca y peso de grano. El rendimiento alto de ORCA (6.1 ton ha⁻¹) probablemente se debió a la baja severidad (0.14) e incidencia (11%) de la enfermedad (Cuadro 2). AS-7573 fue el genotipo en donde inicialmente se observó esta enfermedad en 2003-2004 con incidencia muy alta en plantaciones comerciales, en nuestro estudio presentó una alta incidencia del MBS (18.09), un gran número de mazorca enfermas (10312.5) por hectárea y una severidad alta (0.25), sin embargo, su rendimiento en peso de mazorca y en peso de grano fue estadísticamente similar al de Orca (Cuadro 2). El genotipo AS-7573 posee un alto rendimiento en peso de mazorca. Anguiluz, en 1998, reportó un rendimiento promedio de Asgrow 7573 de 6.4 ton ha⁻¹, en la región de Poza Rica Veracruz, muy similar al obtenido en el presente estudio (5.7 ton ha⁻¹), posiblemente es la razón de que sea preferentemente cultivada en la zona de estudio, además de su precocidad. Sierra *et al.*, (2007) reportaron un rendimiento alto de grano de 4.6 ton ha⁻¹ en el híbrido (CLQ-RWQ10xCLQ-6315)xCML-491, a pesar de su alta incidencia visual al achaparramiento del maíz (53%) en Tlalixcoyan; esto indica que algunos híbridos son altamente rendidores a pesar de la incidencia de esta enfermedad, como sucedió en el presente estudio con AS-7573. Los genotipos ORCA, NUTRIA y CP562 tuvieron los valores más bajos de incidencia a la enfermedad, de los cuales ORCA y NUTRIA fueron estadísticamente superiores en rendimiento (Cuadro 2). CP562 y Pioneer 3086 presentaron baja incidencia (11.5% y 13.7%) y rendimientos de 4.5 ton ha⁻¹ y 4.2 ton ha⁻¹; mientras que 30F92 y CP560 mostraron alta incidencia (18.9% y 21.3%) y rendimientos de 4.2 ton ha⁻¹ y 4.1 ton ha⁻¹, con diferencias altamente significativas. Probablemente el efecto de la enfermedad sobre el rendimiento esté determinado por la frecuencia de plantas susceptibles bajo determinado ambiente, tal como lo reportó Oliveira *et al.*, (2002) acerca de la reducción de la producción de maíz causada por la frecuencia de plantas susceptibles a mollicutes en diferentes cultivares de maíz.

LITERATURA CITADA

- Alstatt, G. E. 1945. A new corn disease in the Rio Grande Valley. *Plant Disease Reporter* 29:533-534.
- Anguiluz, A. 1998. Evaluación de híbridos de maíz (*Zea mays* L.) de grano blanco y amarillo en ambientes de Centroamérica, Panamá y el Caribe en 1996. *Agronomía Mesoamericana* 9:28-37.
- Barros, T. S. L., Davis, R. E., Resende, R. O., and Dally, E. L. 2001. Design of polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. *Plant Disease* 85:475-479.
- Bascopé, D.L. y Galindo, A.J. 1981. Naturaleza micoplásmica de la raza "Mesa Central del achaparramiento" del maíz. *Revista Fitopatología* 16:28-33.
- Campbell, C. L. y Madden, L.V. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. John Wiley and Sons. New York. 532 p.
- CIMMYT, Programa de Maíz, 2004. *Enfermedades del maíz: Una guía para su identificación en el campo*. 4ª. ed. México, D. F. Centro Internacional de Mejoramiento del maíz y trigo. 123 p.
- Davis, R. E. and Worley, J. F. 1973. Spiroplasma: Motile microorganism with corn stunt disease. *Phytopathology* 63:403-408.
- De Oliveira, E., Venceslau, De C. P., Pereira, D. A., Álvarez De A. R., De Oliveira, R. R., De Oliveira M. y César, R. P. 2002. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 1: 38-46.
- García, E. de M. 1987. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía. UNAM. México. 217 p.
- Gijón, H. A., Téliz, O. D., Cárdenas, S. E., De León, C., Mora, A. A., Mejía, S. D., and 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.
- Guigón, L. C. y González, G. P. A. 2001. Estudio regional de la enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49-56.
- 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.
- Hruska, J.A., Gladstone, S. M., and Obando, R. 1996. Epidemic roller coaster: maize stunt disease in Nicaragua. *American Entomologist* 42:248-252.
- Maramorosh, K. 1955. The occurrence of two distinct types of corn stunt in Mexico. *Plant Disease Reporter* 39:896-898.
- Mejía, C. J. A. y Molina, G. J. D. 1999. Comparación de procedimientos para la conversión a rendimiento por hectárea en la evaluación de variedades tropicales de maíz. *Agrociencia* 33: 159-163.
- Nault, L. R. 1980. Maize bushy stunt and corn stunt: A comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. *Phytopathology* 70: 659-662.

Cuadro 2. Comparación de medias de las variables relacionadas con la enfermedad y el rendimiento de 10 genotipos de maíz (*Zea mays*) expuestos a la infección natural de *Maize bushy stunt* en Tlalixcoyan, Veracruz, México. 2007.

Table 2. Comparison of the means of parameters related with the disease and yield of 10 maize genotypes (*Zea mays*) exposed to MBS phytoplasma natural infection in Tlalixcoyan, Ver., Mexico. 2007.

GEN	RTO	MAZTOT	MAZENF	DISMAZ	PSEM	PESENF	DIFPES	DISREND	INCID	SEVER
ORCA	6.18 a	58438 a	5937 b	10.15 cd	4.71 ab	0.79 b	126.50 dc	13.68 ab	11.20 e	0.14 c
AS-7573	5.75 ab	50938 abc	10312 a	20.21 a	5.44 a	0.62 cd	170.31 abc	21.30 dc	18.09 bc	0.25 ab
30F97	5.39 abc	42188 bc	4062 bc	9.51 ed	4.61 ab	1.10 a	154.50 abcd	12.29 a	16.91 cd	0.15 c
30F96	5.37 abc	53333 ab	2916 c	5.59 e	4.22 bc	0.40 e	98.21 d	19.32 bcd	13.06 de	0.15 c
NUTRIA	5.12 abc	42188 bc	5000 bc	11.94 bcd	4.05 bc	0.68 bcd	196.84 a	22.35 d	10.21 e	0.15 c
30F83	5.11 abc	47188 abc	10000 a	21.25 a	4.20 bc	0.70 bc	208.62 a	22.78 d	26.76 a	0.29 a
CP562	4.50 bc	37188 c	5625 bc	15.28 b	3.37 c	0.68 bcd	128.70 bcd	15.76 abc	11.58 e	0.05 d
Pioneer-										
3086	4.29 bc	40000 bc	5625 bc	14.14 bc	3.38 c	0.54 de	175.22 abc	24.43 d	13.73 de	0.17 c
30F92	4.24 bc	38125 bc	5937 b	15.49 b	3.09 c	0.72 bc	185.57 ab	20.44 dc	18.95 bc	0.29 a
CP560	4.15 c	36563 c	5000 bc	13.63 bcd	4.13 bc	0.64 bcd	209.98 a	24.64 d	21.39 b	0.18 bc
Media	4.98	44391	6121	13.92	4.12	0.67	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

Promedios con la misma letra en columnas son estadísticamente iguales (Tukey; $\alpha=0.05$).

GEN=Genotipo, CV=Coeficiente de variación, RTO=Rendimiento en toneladas por hectárea; MAZTOT=Número total de mazorcas cosechadas (piezas por hectárea), MAZENF=Número de mazorcas podridas, sin desarrollar o con presencia de granos vanos por hectárea, DISMAZ=Disminución de mazorcas (%), PSEM=Peso total de grano en toneladas por hectárea, PESENF=Peso de grano en toneladas por hectárea de mazorcas enfermas, (DIFPES)=Peso de mazorcas sanas menos peso de mazorcas enfermas con respecto al peso de mazorcas sana (%), (DISREND)= Peso de grano enfermo con respecto al peso de grano sana expresado en porcentaje, INCID=Incidencia, plantas enfermas con respecto al total y SEVER=Severidad, grado de tejido enfermo.

Cuadro 3. Correlación de las variables relacionadas con la enfermedad *Maize bushy stunt* y el rendimiento del maíz (*Zea mays*) en Tlalixcoyan, Ver. Ciclo primavera-verano 2007.

Table 3. Correlation of variables related with the *Maize bushy stunt* disease and maize (*Zea mays*) yield in Tlalixcoyan, Ver., Mexico. Spring-summer cycle 2007.

	MAZTOT	MAZENF	DISMAZ	PSEM	PESENF	DIFPES	DISREND	INCID	SEVER
RTO	0.7716**	0.2286 NS	-0.1630 NS	0.7062**	0.1937 NS	-0.3474 NS	0.4329**	-0.1809 NS	-0.1452 NS
MAZENF			0.8667**	0.2422 NS	-0.0514**	0.2775 NS	-0.2077 NS	0.4378**	0.5394**
PSEM					0.1738 NS	-0.1128 NS	0.2216 NS	0.0847 NS	-0.0066NS
PESENF						0.1728 NS	0.5820**	0.1006 NS	-0.0059NS
DIFPES							-0.6804**	0.5139**	0.4389**
DISREND								-0.3227 NS	-0.3297 NS
INCID									0.6947**

** significativo con $\alpha \leq 0.01$, NS = no significativo.

RTO=Rendimiento; MAZENF=Mazorcas enfermas, PSEM=Rendimiento en peso de grano, PESENF=Peso de granos enfermos, (DIFPES)=Peso de mazorcas sanas menos peso de mazorcas enfermas con respecto al peso de mazorcas sana (%), DISREND=Disminución de rendimiento en peso de grano, INCID=Incidencia, plantas enfermas con respecto al total y SEVER=Severidad, grado de tejido enfermo.

El análisis de correlación indica que cuando la incidencia de la enfermedad se incrementa, hay presencia de un mayor número de mazorcas enfermas por hectárea ($r=0.43^{**}$), disminuye el peso de grano sano ($r=0.51^{**}$) y aumenta la cantidad de peso de los granos enfermos encontrados ($r=0.51^{**}$). La severidad tiene relación con el peso de granos enfermos, a mayor severidad mayor peso de granos enfermos ($r=0.44^{**}$) y con la cantidad de mazorcas enfermas, a mayor severidad mayor cantidad de mazorcas enfermas ($r=0.54^{**}$) (Cuadro 3). No hubo una relación de la incidencia y la severidad con respecto al rendimiento pero la incidencia de la enfermedad y la severidad están relacionadas de forma significativa ($r=0.69^{**}$) lo cual concuerda con Sierra *et al.*, (2007) quienes también encontraron una correlación altamente significativa ($r=0.86^{**}$) entre estas dos variables (Cuadro 3).

CONCLUSIONES

El fitoplasma *Maize bushy stunt* estuvo involucrado en la enfermedad del maíz que apareció epidémicamente en Veracruz, en 2003-2004 y se asoció con los síntomas de amarillamiento y enrojecimiento foliar, achaparramiento de la planta y producción múltiple de jilotes.

El síndrome de la enfermedad se presentó en la variedad Asgrow 7573 en los municipios de Tlalixcoyan, Cosoleacaque y Paso de Ovejas, Veracruz.

El *Maize bushy stunt* se detectó en los genotipos de maíz Asgrow 7573, CP-562, 30F83, 30F92, Orca, 30F96 y Nutria. Este el primer reporte de su detección en éstos genotipos en México.

La incidencia y severidad de la enfermedad del MBS estuvieron correlacionadas positivamente, pero no tuvieron relación con el rendimiento.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto SAGARPA-CONACYT 12365-2005.

Nault, L.R. 1998. *Dalbulus maydis*. 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). 1998. ISAAA Briefs No. 9. ISAAA: Ithaca, NY and EMBRAPA, Brasilia. 57 pp.

NCBI, 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, consulta Abril 2008.

Oliveira, E., Oliveira, C. M., Souza, I. R. P., Magalhães, P.C., Cruz, I. 2002 Enfezamentos em milho: expressão de sintomas foliares, detecção dos mollicutes e interações com genótipos. Revista Brasileira de Milho e Sorgo 1:53-62.

Ritchie, S. W. y Hanway, J. J. 1982. How a corn plant develops. Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Services, Ames, Iowa. Special Report 48. 21 p.

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.

Statistical Analysis System SAS. 1999. Statistical Analysis System for Windows release 7.1. SAS Inst. Inc., NC, USA.