
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



INTERACCIÓN ENTRE *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae), SU HOSPEDERO *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) Y ENEMIGOS NATURALES DEL HOSPEDERO

por

VERÓNICA PALOMERA AVALOS

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ORIENTACIÓN ECOLOGÍA)

LAS AGUJAS, ZAPOPAN; JALISCO.

MAYO DE 2005

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular, y en el Laboratorio de Ecología de Insectos del Departamento de Botánica y Zoología, División de Ciencias Biológicas y Ambientales del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias; Universidad de Guadalajara y formó parte del proyecto **“Interacción entre insectos vectores de enfermedades a plantas, patógenos y enemigos naturales: un estudio pionero”** con **No. 38689-B** financiado por CONACYT (responsable Dr. Gustavo Moya Raygoza) con la beca número 3159.



CONTENIDO

RESUMEN	8	
ABSTRACT	10	
CAPITULO I: Interacción entre la bacteria <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae), el vector <i>Dalbulus maidis</i> (Hemiptera: Cicadellidae) y el parasitoide <i>Gonatopus bartletti</i> (Hymenoptera: Dryinidae)		11
Introducción	11	
Hipótesis	13	
Materiales y Métodos	13	
Organismos experimentales	13	
Metodología	14	
Análisis Estadístico	17	
Resultados y Discusión	21	
CAPITULO II: Interacción entre la bacteria <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae), el vector <i>Dalbulus maidis</i> (Hemiptera: Cicadellidae) y el hongo entomopatógeno <i>Metarhizium anisopliae</i> (Deuteromycotina: Hyphomycetes).....		30
Introducción	30	
Hipótesis	32	
Materiales y Métodos	32	
Organismos experimentales	32	
Metodología	34	
Análisis Estadístico	36	
Resultados y Discusión	39	

CAPITULO III: <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae), en su hospedero <i>Dalbulus maidis</i> (Hemiptera: Cicadellidae) durante la estación seca en el centro de México	46
Introducción	46
Hipótesis	47
Materiales y Métodos	48
Colecta de Organismos	48
Metodología	48
Resultados y Discusión	49
LITERATURA CITADA	56

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.** Detección por PCR de la bacteria *S. kunkelii* en ninfas y adultos de *D. maidis* parasitados y sin parasitar por *G. bartletti*. n = número total de individuos procesados.....29
- Cuadro 2.** Identificación por PCR de la bacteria *S. kunkelii* en ninfas y adultos de *D. maidis* con y sin el hongo *M. anisopliae*. n = número total de individuos procesados.....45
- Cuadro 3.** Datos climáticos de sitios de colecta de *D. maidis* considerando los años de muestreo52
- Cuadro 4.** 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 (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.....53
- Cuadro 5.** 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.....54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Primer Experimento con <i>Gonatopus bartletti</i>	19
Figura 2. Segundo Experimento con <i>Gonatopus bartletti</i>	20
Figura 3. Tercer Experimento con <i>Gonatopus bartletti</i>	21
Figura 4. Adulto de <i>Dalbulus maidis</i> parasitado por <i>Gonatopus bartletti</i>	25
Figura 5. Amplificación por PCR de la secuencia del gen <i>spiralin</i> de la bacteria <i>Spiroplasma kunkelii</i> . Carril 1, Marcador de ADN 1 kb (Promega). Carril 2, agua como control negativo. Carril 3, ADN purificado del espiroplasma como control positivo. Carril 4, chicharrita sana como control negativo. Carril 5, Chicharrita infectada (inyectada) como control positivo. Carriles 6-20, ADN de insectos parasitados e infectados con <i>S. kunkelii</i> . Carriles 6-13, chicharritas con presencia de la bacteria. Carriles 14-20, chicharritas sin presencia de la bacteria.....	25
Figura 6. Porcentajes de supervivencia en adultos de <i>Dalbulus maidis</i>	26
Figura 7. Porcentaje de supervivencia en adultos de <i>Dalbulus maidis</i>	27
Figura 8. Porcentajes de supervivencia en ninfas de <i>Dalbulus maidis</i>	28
Figura 9. Primer Experimento con <i>Metarhizium anisopliae</i>	37
Figura 10. Segundo Experimento con <i>Metarhizium anisopliae</i>	38
Figura 11. Porcentajes de supervivencia en ninfas de <i>Dalbulus maidis</i>	42

Figura 12. Porcentajes de supervivencia en adultos de *Dalbulus maidis*43

Figura 13. Adulto de *Dalbulus maidis* muerto por la infección del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*44

Figura 14. Amplificación por PCR de la secuencia del gen *spiralin* de la bacteria *Spiroplasma kunkelii*. Carril 1, marcador de ADN 1 kb (Promega). Carril 2, agua como control negativo. Carril 3, ADN purificado del espiroplasma como control positivo. Carril 4, chicharrita sana como control negativo. Carril 5, chicharrita infectada (inyectada) como control positivo. Carriles 6-20, ADN de insectos colectados durante la estación seca. Carriles 11 y 15, chicharritas con presencia de la bacteria.....55

RESUMEN

Con el invento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 1983 se han podido responder diferentes preguntas en Biología. En particular en el año 2001 fue posible detectar por PCR a diferentes especies de espiroplasmas; y así responder varios tipos de cuestionamientos acerca de estos espiroplasmas (algunos son transmitidos por homópteros). Estos espiroplasmas son importantes ya que algunos provocan pérdidas en cultivos. En este estudio se mostró el efecto de la avispa parasitoide *Gonatopus bartletti* sobre la bacteria *Spiroplasma kunkelii*, cuando es transmitida por ninfas y adultos de *Dalbulus maidis* (capítulo uno). Además, se determinó el efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (aislamiento M 362) sobre ninfas y adultos de *D. maidis* y la bacteria *S. kunkelii* (capítulo dos). También se determinó si la bacteria *S. kunkelii* pasa la estación seca dentro de su vector *D. maidis* en dos tipos de hábitat (maíz bajo irrigación y maíz de secano) (capítulo tres). Los resultados de este trabajo mostraron que la presencia de la bacteria en ninfas y adultos de *D. maidis* no le confirió resistencia contra el desarrollo larval del parasitoide. Por el contrario, la presencia del parasitoide condujo a una disminución significativa del número de chicharritas con presencia de la bacteria. Por otro lado, los resultados muestran que el hongo *M. anisopliae* no tienen un efecto negativo sobre la bacteria cuando ambos viven en ninfas y adultos de *D. maidis*. Sin embargo, la presencia de *S. kunkelii* fue menor en ninfas que en adultos cuando ambos fueron expuestos a la bacteria y al hongo *M. anisopliae*. Sugiriendo que el efecto del hongo sobre *S. kunkelii* puede estar relacionado con el estado de desarrollo del hospedero *D. maidis*. Además, el máximo porcentaje de chicharritas con presencia de la bacteria

fue encontrado en altitudes bajas durante los dos años (2000-2001 y 2003-2004) del estudio. En Colima (495 m) el máximo porcentaje de individuos infectados fue de 20.0%, en El Grullo (880 m) del 40%, en Sayula (1,366 m) del 6.6%, mientras que en Zapopan (1,570 m) no se detecto la presencia de la bacteria en las chicharritas procesadas. Estos resultados confirman que la distribución de la bacteria 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 perdidas de maíz por efecto de esta bacteria.

ABSTRACT

Since the invention of the polymerase chain reaction (PCR) in 1983 several questions in biology have been addressed. Specifically this technique can be used to detect the presence of some spiroplasmas (e.g. *Spiroplasma kunkelii*) transmitted by leafhoppers. These spiroplasmas are important because some produce significant losses to crop. I used in this study the PCR to know the effect of the parasitic wasp *Gonatopus bartletti* over *S. kunkelii*, when the spiroplasma is transmitted by nymphs and adults of the corn leafhopper *Dalbulus maidis* (first chapter). I evaluated the effect of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (strain M362) over nymphs and adults of *D. maidis* and *S. kunkelii* (second chapter). Also, I investigated whether *S. kunkelii* overwinters into *D. maidis* adults on two habitats (maize with and without irrigation) (third chapter). Results in this study showed that *S. kunkelii* did not produce resistance to nymphs and adults of *D. maidis* against the larva of the parasitic wasp. But, the larva of the parasitoid reduced the survival of *S. kunkelii* in *D. maidis*. Also, I found that the fungus *M. anisopliae* does not have negative effect over *S. kunkelii* when both inhabit in nymphs and adults of *D. maidis*. *Spiroplasma kunkelii* overwinters in *D. maidis* adults especially in maize grown with irrigation in low elevation. In Colima (495 m) and El Grullo (880 m) where maize is irrigated in the winter 20.0% and 40.0% of leafhoppers, respectively, tested positive to the presence of the *S. kunkelii*, while in Sayula (1,366 m) and Zapopan (1570 m) the presence of the spiroplasmas was 6.6% and 0.0%, respectively. These results confirm that *S. kunkelii* is found at low elevations not only during the growing (wet) season, but also during the dry (winter) season.

CAPITULO I

Interacción entre la bacteria *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae), el vector *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) y el parasitoide *Gonatopus bartletti* (Hymenoptera: Dryinidae).

INTRODUCCIÓN

La chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) es una de las plagas del maíz (*Zea mays*) más importantes en América Latina (Nault 1993). Las chicharritas son importantes vectores de tres agentes patógenos que causan achaparramiento del maíz: 1) el virus del maíz rayado fino, 2) el espiroplasma del maíz (*Spiroplasma kunkelii*) y 3) el fitoplasma del maíz (Nault 1980). Esta chicharrita se encuentra en el sureste y suroeste de Estados Unidos (California, Florida y Texas), en todo México, en las Islas del Caribe y al sur de Argentina (Barnes 1954; Nault 1989). De estos tres patógenos, el espiroplasma es el que causa mayor pérdida de cultivos de maíz (*Zea mays*), en el sur de México llega a ser hasta un 50%; y en Centro América y Brasil hasta un 100% (Kathirithamby y Moya-Raygoza 2000).

Spiroplasma kunkelii pertenece a la clase Mollicuta y es una bacteria que se caracteriza por la ausencia de pared celular; esta bacteria parásita el floema de la planta de maíz (*Zea mays*), pero no es patogénica para *D. maidis* (Ebbert y Nault 1994). *S. kunkelii* puede ser transmitida por ninfas y adultos de *D. maidis* después de un periodo de latencia de dos semanas (Purcell y Nault 1991) y se transmite de

manera persistente-propagativa (Bai y Hogenhout 2002). El espiroplasma se distribuye preferentemente en altitudes bajas y es común encontrar plantas de maíz con síntomas por el espiroplasma desde el nivel del mar hasta los 1,000 m (Barnes 1954; Davis 1973, 1977; Nault 1983).

Los adultos de la chicharrita del maíz son parasitados en condiciones naturales por *Gonatopus bartletti* Olmi (Hymenoptera: Dryinidae), *Halictophagus naulti* Kathirithamby y Moya-Raygoza (Strepsiptera: Halictophagidae) y *Metadorylas spinosus* Hardy (Diptera: Pipunculidae) (Vega y Barbosa 1990; Vega *et al.*, 1991; Moya-Raygoza y Trujillo-Arriaga 1993; Kathirithamby y Moya-Raygoza 2000; Moya-Raygoza *et al.*, 2004). De las tres especies de parasitoides, *G. bartletti* es la más ampliamente distribuida tanto temporal como geográficamente en México, además de mostrar la tasa mas alta de parasitismo sobre *D. maidis* (Moya-Raygoza *et al.*, 2004). Esta especie de parasitoide al igual que el espiroplasma se distribuye en altitudes bajas, por lo que, tanto el parasitoide como la bacteria deben interactuar en el mismo huésped (*D. maidis*) a través de su distribución geográfica.

Hasta ahora se tiene conocimiento de la interacción entre patógenos (virus y bacterias) con plantas y sus insectos vectores. Además, se conoce la interacción entre el vector y sus parasitoides. Sin embargo, aún se desconoce la interacción entre el patógeno con plantas y el parasitoide cuando ambos tienen que compartir en el mismo huésped (insecto vector). Por lo tanto, el objetivo en este trabajo es determinar el efecto de la avispa parasitoide *G. bartletti* sobre la bacteria *S. kunkelii*, cuando es transmitida por ninfas y adultos de *D. maidis*.

HIPÓTESIS

La avispa *G. bartletti* compite por el nicho con el patógeno *S. kunkelii* en la chicharrita del maíz *D. maidis* provocando la muerte del patógeno dentro del vector.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos experimentales

Hembras y machos de *D. maidis* se colectaron con una red de golpeo en la localidad de Ayuquila, El Grullo, Jalisco (19°50' latitud Norte y 104°16' longitud Oeste). Los organismos colectados fueron identificados según las claves de Triplehorn y Nault (1985) y se mantuvieron durante 4 meses en el año 2003 en plantas de maíz sanas para el establecimiento de colonias en el invernadero del Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA en la Universidad de Guadalajara. También se colectaron *D. maidis* adultos con evidencias de parasitismos por *G. bartletti* para posteriormente obtener hembras y efectuar los experimentos. Las plantas de maíz infectadas con el espiroplasma que se utilizaron fueron colectadas en la localidad de Coquimatlan, en Colima, Colima (19°13' latitud Norte y 103°45' longitud Oeste).

Metodología

Para determinar el efecto de la avispa parasitoide *G. bartletti* sobre la bacteria *S. kunkelii*, cuando es transmitida por ninfas y adultos de *D. maidis* se realizaron los siguientes tres experimentos:

En el primer experimento se llevaron a cabo tres tratamientos. En el tratamiento uno se expusieron *D. maidis* adultos de una semana de edad a plantas de maíz infectadas por el espiroplasma por un periodo de 72 h para que adquirieran a *S. kunkelii*. Después los adultos se transfirieron a plantas de maíz sanas; un día después los adultos fueron expuestos por 48 h a hembras de *G. bartletti* para ser parasitados (Fig. 1a). Los individuos para el tratamiento dos no fueron parasitados, pero si adquirieron el espiroplasma y fueron mantenidos bajo las mismas condiciones que en el tratamiento uno (Fig. 1b). Para el tratamiento tres sólo se tuvieron adultos sanos de *D. maidis* (Fig. 1c).

En el segundo experimento también se llevaron a cabo tres tratamientos. En el primer tratamiento se expusieron *D. maidis* adultos de una semana de edad con hembras de *G. bartletti* por un periodo de 48 h para ser parasitados. Después los adultos se colocaron en plantas de maíz infectadas con *S. kunkelii* por un periodo de 72 h para que adquirieran el espiroplasma y finalmente los adultos fueron transferidos a plantas de maíz sanas (Fig. 2a). Los individuos para el segundo tratamiento no fueron parasitados, pero si adquirieron el espiroplasma y fueron mantenidos bajo las mismas condiciones que en el primero (Fig. 2b). Para el tercer tratamiento sólo se tuvieron adultos sanos de *D. maidis* (Fig. 2c).

En el tercer experimento se llevaron a cabo tres tratamientos. En el primero se expusieron *D. maidis* ninfas de medio estadio a plantas de maíz infectadas con

el espiroplasma por un periodo de 72 h. Después las ninfas fueron transferidas a plantas de maíz sanas. Al siguiente día se expusieron a hembras de *G. bartletti* por un periodo de 48 h para que fueran parasitadas (Fig. 3a). Los individuos para el segundo tratamiento no fueron parasitados, pero si adquirieron el espiroplasma y fueron mantenidos bajo las mismas condiciones que en el primero (Fig. 3b). Para el tercer tratamiento solo se tuvieron ninfas sanas de *D. maidis* (Fig. 3c).

Para cada tratamiento de los anteriores tres experimentos, se realizaron cuatro repeticiones y cada una de estas tuvo 10 individuos; por lo tanto se tuvieron 40 adultos o ninfas por tratamiento. Cada repetición se efectuó en cajas tipo hoja en plantas de maíz, y se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con las siguientes condiciones: temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, humedad relativa 50% y fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Después de que se iniciaron los tres tratamientos en cada uno de los experimentos se contó la supervivencia de *D. maidis* diariamente por un periodo de 22 días. Al noveno día después de que *D. maidis* fue expuesta al parasitoide se tomaron al azar individuos de *D. maidis* con evidencia de parasitismo (Fig. 4), de los primeros y segundos tratamientos en todos los experimentos. Los individuos seleccionados fueron almacenados a -80°C en un ultracongelador (Nuaire – NU6514), para posteriormente extraerles el material genético y determinar la presencia de *S. kunkelii* con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita por Barros *et al.* (2001).

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 nucleidos (Sambrook *et al.*, 1989). El rendimiento de ADN reportado con este método es de 500 a 800 ng mg⁻¹ de tejido fresco con una pureza mayor a 1.77 (260/280 DO). No se observa contaminación de ARN y el ADN no se degrada durante su extracción. 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 de nucleótidos del gen spiralin de *S. kunkelii* ya han sido determinados por Foissac X *et al.* (1997). La secuencia completa del 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 µL, siguiendo el método de Barros *et al.* (2001), cada reacción contenía: 5 µL de ADN (40 ng/µL), 0.4 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, amortiguador 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM de MgCl₂ y 1.5 Unidades de *Taq* ADN polimerasa recombinante (Invitrogen, 5 U/µL). Las muestras se amplificaron en un termociclador (MJ Research, Inc PTC-100.) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C

por 30 segundos, alineación a 55°C por 1 min, elongación a 72°C por 2 min, finalmente, elongación prolongada a 72°C por 10 min.

Además de haber procesado individualmente los especímenes seleccionados de los tres experimentos 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 control fue agua, el tercer control fueron adultos de *D. maidis* infectados (inyectados) con el espiroplasma y el cuarto control fueron 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 (Fig. 5).

Análisis estadístico

La comparación de la presencia y ausencia de *S. kunkelii* en los individuos de *D. maidis* del primer y segundo tratamiento de cada experimento, se efectuó con la prueba no paramétrica exacta de Fisher usando el programa STATISTICA, versión 6 (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los insectos infectados con la bacteria sobrevivieron en un 100%, mientras que en los sanos fue de un 80% (Fig. 6). En los individuos que primero fueron infectados por *S. kunkelii* y después fueron parasitados por *G. bartletti* la supervivencia disminuyó gradualmente hasta el día 12 del experimento. En el día 10 a punto de emerger la larva se observó un 50% de *D. maidis* vivas en este tratamiento. Este valor es cercano al porcentaje de supervivencia de *D. maidis* sin bacteria pero parasitadas con hembras de *G. bartletti* que fue de 40% obtenido por Ríos-Reyes y Moya-Raygoza (2004). En este tratamiento la supervivencia se mantuvo constante a partir del día 13, por lo tanto, todos los insectos que quedaron vivos no fueron parasitados por *G. bartletti*.

En el segundo experimento no se observaron diferencias para la supervivencia de *D. maidis* infectados y sanos (Fig. 7). Para el tratamiento donde primero se parasitaron *D. maidis* adultas y luego se infectaron con *S. kunkelii*, la supervivencia disminuyó continuamente hasta el día 9 del experimento. A partir del día 10 la supervivencia se mantuvo casi constante; al igual que en el anterior experimento, las chicharritas que quedaron vivas no mostraron evidencias de parasitismo por *G. bartletti*.

En ninfas de *D. maidis* tampoco se observaron diferencias para la supervivencia de insectos sanos e infectados por *S. kunkelii* (Fig. 8). En los individuos que primero se infectaron con *S. kunkelii* y después fueron parasitados por *G. bartletti*, la supervivencia disminuyó continuamente hasta el día 10 del experimento. A partir del día 11 la supervivencia se mantuvo casi constante, y los

individuos que quedaron vivos a partir de ese día no fueron parasitados por *G. bartletti*.

Los análisis realizados con PCR para identificar la presencia de *S. kunkelii*, mostraron la ausencia de la bacteria en individuos de *D. maidis* adultos que primero fueron infectados con *S. kunkelii* y después parasitados con hembras de *G. bartletti*, comparativamente con los individuos que sólo adquirieron *S. kunkelii* (Cuadro 1). Las chicharritas adultas que primero fueron parasitadas y después infectadas por *S. kunkelii*, también mostraron la ausencia de *S. kunkelii*, en comparación con los individuos que solo estaban infectados con el espiroplasma (Cuadro 1). Las ninfas de *D. maidis* infectadas con *S. kunkelii* y parasitadas también mostraron la ausencia de *S. kunkelii* comparados con los individuos que solo tenían la bacteria.

La presencia de *S. kunkelii* en ninfas y adultos de *D. maidis* no le confirió resistencia contra el desarrollo larval del parasitoide. Por el contrario, la presencia del parasitoide condujo a una disminución significativa del número de chicharritas con presencia de *S. kunkelii*. En otros casos de estudio donde se ha incluido al artrópodo huésped, insecto parasitoide y virus (pero que atacan al artrópodo), se ha encontrado que los virus como *Polidnavirus* tienen un mutualismo obligatorio con avispas parasíticas de las familias Braconidae e Ichneumonidae. El *Polidnavirus* es requerido para la supervivencia del huevo del parasitoide, después de ser inyectado dentro del artrópodo huésped, el lepidóptero *Heliothis virescens* (Fabricius) y el díptero *Drosophila* sp., lo anterior se debe a que el virus impide la respuesta inmune del artrópodo huésped hacia el huevo del parasitoide. La inmunidad depende de una proteína producida por el virus, que se acumula en el

plasma donde envuelven a los hemocitos para inhibir la encapsulación de los huevos inyectados por el parasitoide (Li y Webb 1994; Webb y Luckhart 1994, 1996; Luckhart y Webb 1996). Investigaciones recientes de competencia interespecífica entre diferentes tipos de bacterias simbiotes secundarias (Tipo R y T) y parasitoides himenopteros de la familia Braconidae han demostrado que estos simbiotes secundarios confieren resistencia al ataque de los parasitoides, causando una alta mortalidad en el desarrollo de las larvas (Oliver *et al.*, 2003). En otro estudio en donde un virus (virus de la cebada amarilla pequeña) y un afido parasitoide comparten el mismo huésped *Sitobion avenae* (Fabricius) (Homoptera: Aphididae) se encontró que el desarrollo de la larva del parasitoide fue significativamente retrasado cuando la adquisición del virus tomo lugar antes o poco después de que el parasitoide emergiera, pero no cuando el parasitoide estuvo en el segundo estadio larval durante la adquisición del virus (Christiansen-Weniger *et al.*, 1998). En algunos casos en donde se utilizan a los virus como control de plagas, una proporción de insectos infectados con estos virus también son parasitados por himenópteros o dípteros parasitoides y puede ocurrir una competencia interespecífica por el huésped. En resultados encontrados al estudiar el parasitoide *Chelonus insularis* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) y su huésped *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), este último infectado con el virus nucleopolihedrovirus mostraron una marcada reducción en el crecimiento del huésped además de un incremento en la producción del virus en larvas infectadas en estadios tardíos. La competencia interespecífica resultó en una disminución en la producción del patógeno en larvas parasitadas infectadas

en el cuarto estadio, pero no en larvas parasitadas e infectadas en estadios más tempranos (Escribano *et al.*, 2001).

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio muestran que la competencia interespecífica entre *S. kunkelii* y el parasitoide *G. bartletti* resulta en una significativa disminución de la presencia de *S. kunkelii* en ninfas y adultos de *D. maidis*.



Figura 4. Adulto de *Dalbulus maidis* parasitado por *Gonatopus bartletti* (40X).



Figura 5. Amplificación por PCR de la secuencia del gen *spiralin* de la bacteria *Spiroplasma kunkelii*. Carril 1, Marcador de ADN 1 kb (Promega). Carril 2, PCR con agua como control negativo. Carril 3, PCR con ADN purificado del espiroplasma como control positivo. Carril 4, PCR con ADN purificado de chicharrita sana como control negativo. Carril 5, PCR con ADN de chicharrita infectada (inyectada) como control positivo. Carriles 6-20, PCR con ADN de insectos parasitados e infectados con *S. kunkelii*. Carriles 6-13, chicharritas con presencia de la bacteria. Carriles 14-20, chicharritas sin presencia de la bacteria.

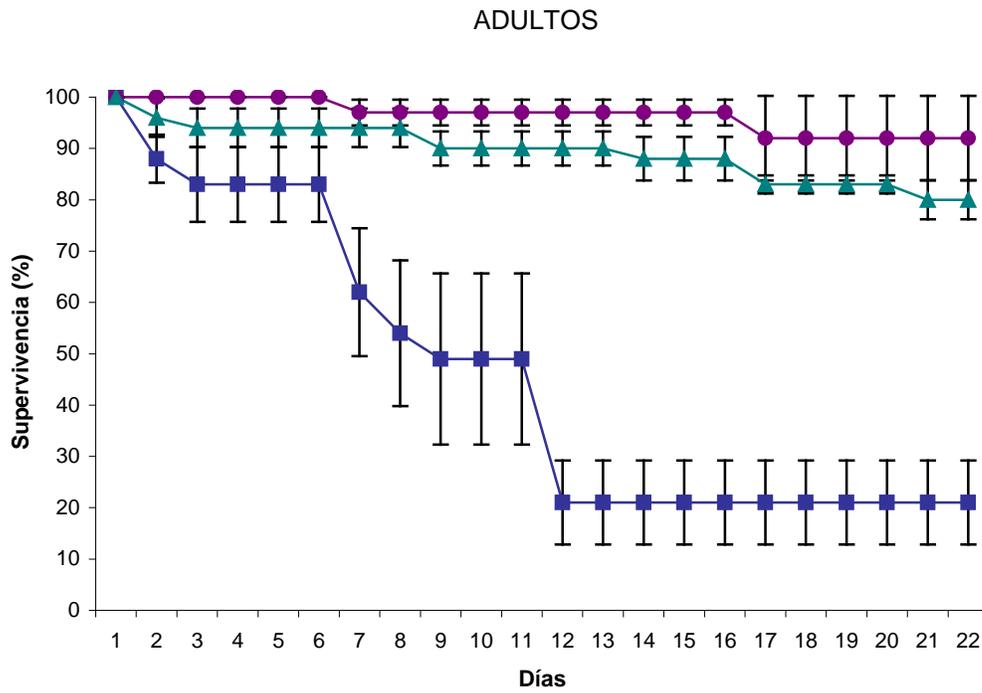


Figura 6. Porcentajes de supervivencia en adultos de *Dalbulus maidis*. Adultos con *S. kunkelii* y parasitados (■); adultos con *S. kunkelii* (●); adultos sanos (▲).

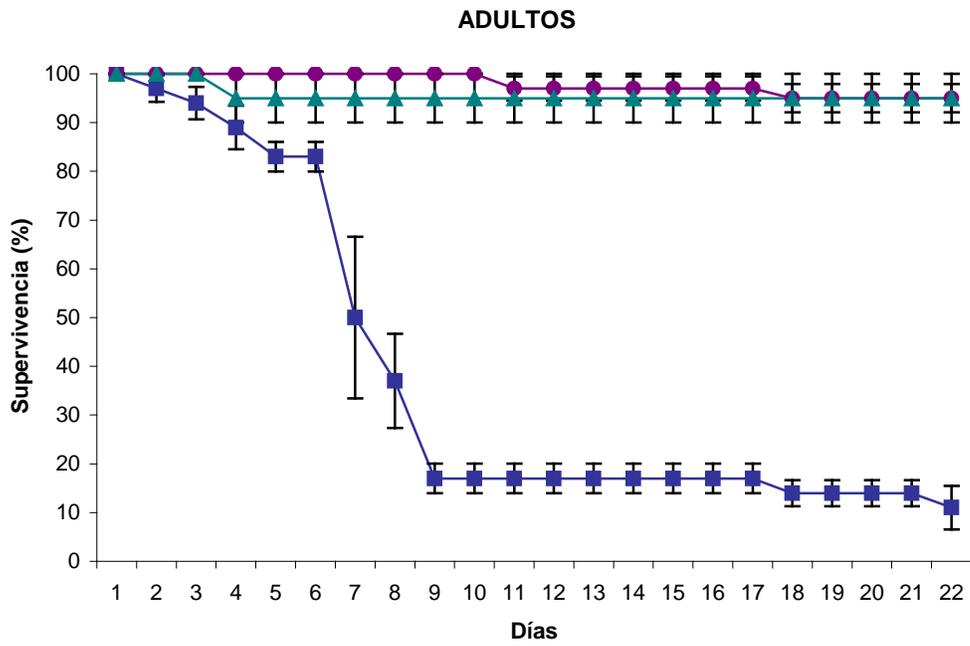


Figura 7. Porcentajes de supervivencia en adultos de *Dalbulus maidis*. Adultos parasitados y con *S. kunkelii* (■); adultos con *S. kunkelii* (●); adultos sanos (▲).

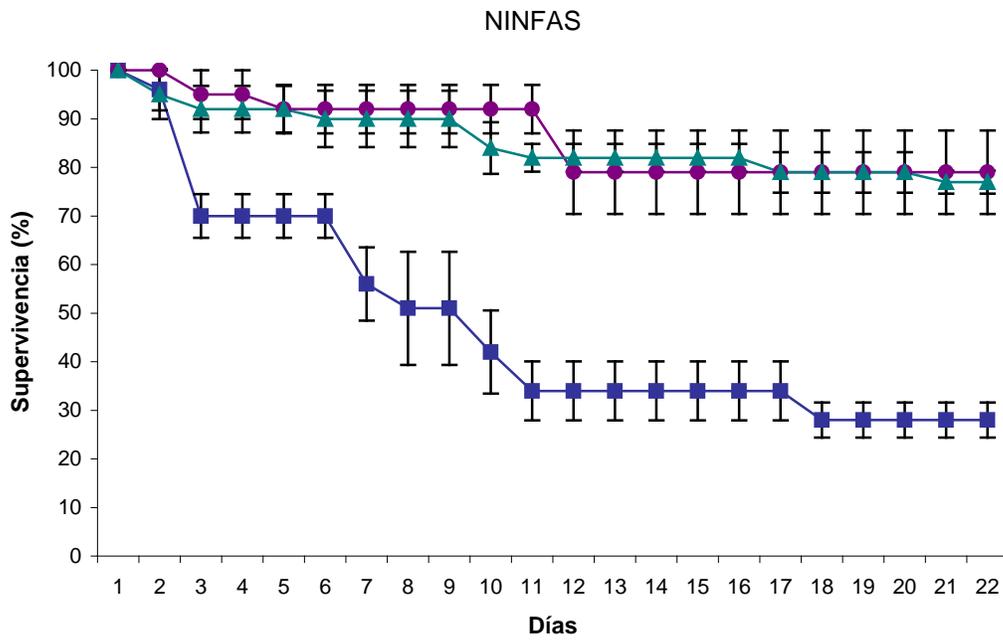


Figura 8. Porcentajes de supervivencia en ninfas de *Dalbulus maidis*. Ninfas con *S. kunkelii* y parasitados (■); ninfas con *S. kunkelii* (●); ninfas sanos (▲).

Cuadro 1. Detección por PCR de la bacteria *S. kunkelii* en ninfas y adultos de *D. maidis* parasitados y sin parasitar por *G. bartletti*. n = número total de individuos procesados.

Chicharritas	Tratamientos	n	Presencia de la bacteria	Prueba exacta de Fisher
<i>Dalbulus maidis</i> ADULTOS	bacteria	20	75%	$P = 0.005$
	bacteria + parasitoide	24	33.3%	
<i>Dalbulus maidis</i> ADULTOS	bacteria	36	83.3%	$P = 0.0001$
	parasitoide + bacteria	26	11.6%	
<i>Dalbulus maidis</i> NINFAS	bacteria	18	72.2%	$P = 0.0001$
	bacteria + parasitoide	23	17.4%	

CAPITULO II

Interacción entre la bacteria *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae), el vector *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) y el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes).

INTRODUCCIÓN

La chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) es un insecto de importancia económica, ya que ocasiona la enfermedad llamada “achaparramiento del maíz”, considerada como uno de los factores limitantes mas importantes para la producción de maíz en América Latina (Nault 1989, 1990). Esta enfermedad es producida por tres patógenos, de los cuales uno es *Spiroplasma kunkelii* (Nault 1980). Este patógeno es transmitido a plantas de maíz vía saliva y de manera persistente- propagativa por medio de su vector *D. maidis* (Bai y Hogenhout 2002). *Spiroplasma kunkelii* es una bacteria que carece de pared celular y pertenece a la clase Mollicuta, familia Spiroplasmataceae dentro del orden Mycoplasmatales (Davis 1977). *D. maidis* al alimentarse de una planta de maíz infectada por *S. kunkelii* adquiere esta bacteria, la que llega al intestino medio, posteriormente pasa a la hemolinfa en donde se multiplica y luego pasa a las glándulas salivales para infectar a insectos sanos. Los anteriores pasos ocurren en un periodo de latencia de 20 días (Purcell y Nault 1991).

Hasta la fecha, se han identificado dos especies de hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin y *Beauveria*

bassiana (Balsamo) Vuillemin que infectan a *D. maidis* en condiciones naturales en Nicaragua (Vega y Barbosa 1990). Experimentalmente se ha demostrado que el hongo *M. anisopliae* (aislamiento M 362) es el que produce mayor porcentaje de mortalidad y esporulación en comparación con diferentes cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, en la chicharrita del maíz (Ibarra-Aparicio *et al.*, en prensa).

Metarhizium anisopliae es un Deuteromycete, que presenta una reproducción por conidios (esporas asexuales). Esta especie tiene una distribución cosmopolita, ya que se reporta en distintos lugares del mundo, debido a su alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales (Zimmermann 1993).

Existen varios trabajos que muestran la interacción que hay entre bacterias patogénicas a plantas y sus insectos vectores. Sin embargo, hay poca información acerca de la interacción entre el vector y hongos entomopatógenos. Específicamente se desconoce la interacción entre bacterias patogénicas a plantas y hongos entomopatógenos cuando ambos tienen que vivir en el mismo huésped (insecto vector). Por lo que, el objetivo en este trabajo fue determinar el efecto del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* (aislamiento M 362) sobre ninfas y adultos de *D. maidis* y la bacteria *S. kunkelii*.

HIPÓTESIS

El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* compite por el nicho con el patógeno *S. kunkelii* en la chicharrita del maíz *D. maidis* provocando la muerte del patógeno dentro del vector.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos experimentales

Hembras y machos de *D. maidis* se colectaron con una red de golpeo en la localidad de Coquimatlan en Colima, Colima (19°13' latitud Norte y 103°45' longitud Oeste). Los organismos colectados fueron identificados según las claves de Triplehorn y Nault (1985) y se mantuvieron en plantas de maíz sanas para el establecimiento de colonias en el invernadero del Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA en la Universidad de Guadalajara. Las plantas de maíz infectadas con el espiroplasma que se utilizaron también fueron colectadas en la localidad de Coquimatlan en Colima, Colima.

La cepa del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* aislamiento M 362, se obtuvo del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (SAGARPA). Para la siembra del hongo, se tomaron las esporas del aislamiento de un tubo matriz con la ayuda de una asa y bajo la campana de flujo laminar. Dichas esporas fueron sembradas en tubos inclinados con medio de agar dextrosa sabouraud, especial para hongos. Los cuales se incubaron a 27°C ± 2, por un periodo de 8 días, con el propósito de obtener una gran cantidad de esporas.

Después, en condiciones estériles se llevo a cabo la extracción de esporas de la siguiente manera: a cada tubo que se sembró, se le agregó una cantidad arbitraria de agua bidestilada tratando de cubrir toda el área donde creció el hongo. Con un asa se raspo el área donde creció el hongo para desprender el mayor número de esporas y se vertió en un tubo limpio para homogeneizar la solución usando un vortex para posteriormente realizar el conteo.

Posteriormente, en 500 mL de agua estéril se colocó una gota del dispersante tween 80 (Sigma) y 1 mL de las esporas extraídas. Se homogenizó y se tomó una gota con una pipeta Pasteur, la cual se colocó en una cámara hematocimétrica de Neubauer. Para los cálculos de la dilución se aplicó la siguiente formula:

No. de esporas = (promedio de conidios /campo) x (factor dilución) x (factor de cámara)

Obteniendo así la concentración de la suspensión madre o inicial (Lecuona 1996; Berlanga 2002). Una vez determinada la cantidad de esporas / mL., se hicieron las diluciones necesarias para aproximar lo más posible a la concentración de esporas a 1×10^7 /mL.

Metodología

Para determinar el efecto del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* sobre la supervivencia de ninfas y adultos de *D. maidis* con y sin bacteria se realizaron dos experimentos:

En el primer experimento se llevaron a cabo tres tratamientos. En el tratamiento uno se expusieron *D. maidis* ninfas de medio estadio por un período de 72 h en plantas de maíz infectadas con *S. kunkelii*. Después las ninfas fueron transferidas a plantas de maíz sanas. Cinco días después se asperjaron con *M. anisopliae* en jaulas tipo botella invertida y se mantuvieron ahí por 72 h, después se transfirieron a cajas tipo hoja. Dichas ninfas continuaron en plantas de maíz sanas (Fig. 9a). Los individuos para el segundo tratamiento no fueron infectados por *M. anisopliae*, pero si adquirieron el espiroplasma y fueron mantenidos bajo las mismas condiciones que en el primer tratamiento (Fig. 9b). Para el tercer tratamiento solo se tuvieron ninfas sanas de *D. maidis* (Fig. 9c).

En el segundo experimento también se llevaron a cabo tres tratamientos. En el primer tratamiento se expusieron *D. maidis* adultos de una semana de edad por un período de 72 h en plantas de maíz infectadas con *S. kunkelii*. Después de ese tiempo los adultos fueron transferidos a plantas de maíz sanas. Cinco días después se asperjaron con *M. anisopliae* en jaulas tipo botella invertida y se mantuvieron en estas por 72 h, después se transfirieron a cajas tipo hoja. Los adultos continuaron en plantas de maíz sanas (Fig. 10a). Los individuos para el segundo tratamiento no fueron infectados por *M. anisopliae*, pero si adquirieron a *S. kunkelii* y se mantuvieron bajo las mismas condiciones que en el primer

tratamiento (Fig. 10b). Para el tercer tratamiento solo se tuvieron adultos sanos de *D. maidis* (Fig. 10c).

Metarhizium anisopliae se asperjó utilizando 6 mL de suspensión 1×10^7 esporas /mL previamente descrita y usando un atomizador. La anterior concentración se aplicó en cada repetición del primer tratamiento del primer y segundo experimento.

Para cada tratamiento de los anteriores dos experimentos se efectuaron 12 repeticiones y cada una de estas tuvo cinco individuos, por lo tanto se tuvieron 60 *D. maidis* por tratamiento. Cada tratamiento se mantuvo en un cuarto de crecimiento con las siguientes condiciones: temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$; humedad relativa 50% y fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Después de que se iniciaron los tres tratamientos en cada uno de los experimentos se contó la supervivencia de *D. maidis* diariamente por un periodo de 22 días.

Además se determinó el efecto de *M. anisopliae* sobre *S. kunkelii* cuando es transmitida por ninfas y adultos de *D. maidis*. Para efectuar lo anterior se tuvieron cuatro cajas de madera con *D. maidis*. En la primer caja se tuvieron ninfas infectadas con *S. kunkelii*, en la segunda caja se tuvieron adultos infectados con *S. kunkelii*, en la tercer caja se tuvieron ninfas infectadas con *S. kunkelii* y con *M. anisopliae* y en la cuarta caja se tuvieron adultos infectados con *S. kunkelii* y con *M. anisopliae*. Al noveno día de que fueron montados los insectos en las cajas de madera se seleccionaron al azar *D. maidis* de cada caja y se almacenaron a -80°C en un ultracongelador (Nuair – NU6514) para posteriormente extraerles su ADN y determinar la presencia de *S. kunkelii* con PCR.

La extracción de ADN se llevó a cabo con el protocolo de Aljanabi y Martínez (1997). El ADN de la bacteria se amplificó con la técnica de PCR siguiendo el método de Barros *et al.* (2001), las condiciones de ambos protocolos fueron descritas en el capítulo anterior.

Además de haber procesado individualmente los especímenes seleccionados de los tres experimentos 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 *S. kunkelii*, el segundo agua, el tercero adultos de *D. maidis* infectados (inyectados) con *S. kunkelii* y el cuarto adultos sanos.

Análisis Estadístico

La comparación en la presencia de *S. kunkelii* entre individuos de *D. maidis* con y sin *M. anisopliae* se efectuó con la prueba no paramétrica exacta de Fisher usando el programa STATISTICA versión 6 (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La supervivencia de ninfas sanas de *D. maidis* y de ninfas que adquirieron a *S. kunkelii*, fue similar llegando en ambos tratamientos alrededor del 90% el día 22 (Fig. 11). Mientras que las ninfas que adquirieron a *S. kunkelii* y luego fueron asperjadas con *M. anisopliae* fue menor, llegando alrededor de 50% el día 22.

Además, la supervivencia de adultos sanos de *D. maidis* y de adultos que adquirieron *S. kunkelii* también fue similar alcanzando un 90% de supervivencia en los dos tratamientos al día 22 (Fig. 12). Por otro lado, los adultos que adquirieron *S. kunkelii* y luego fueron expuestos a *M. anisopliae* tuvieron una supervivencia similar a la de los adultos que solo fueron expuestos a *M. anisopliae*, llegando alrededor de un 70% de supervivencia en ambos tratamientos el día 22. La mayor mortalidad de *D. maidis* sólo expuestas al hongo ocurrió el día 10, siendo similar a los obtenidos por Ibarra-Aparicio *et al.* (en prensa), cuando los adultos sólo fueron expuestos a *M. anisopliae*, ya que ellos encontraron que la mayor mortalidad ocurre entre los 10 y 12 días. Además, individuos asperjados con *M. anisopliae* mostraron evidencias de esporulación sobre su cuerpo a los cuatro días posteriores a su muerte (Fig. 13).

Las ninfas que adquirieron a *S. kunkelii* y luego fueron infectadas con *M. anisopliae* tuvieron menor supervivencia, que los adultos que también fueron expuestos a *S. kunkelii* y a *M. anisopliae*, ya que las ninfas alcanzaron un 50% y los adultos un 75% de supervivencia al día 22 (Figs. 11 y 12). Al respecto, se encontró que ninfas del homóptero *Aeneolamia varia* (Fabricius) (Homoptera: Cercopidae) son mas susceptibles que los adultos al ataque de *M. anisopliae* (Arango *et al.*, 1994).

La presencia de *S. kunkelii*, determinada con PCR, fue similar ($P = 0.07$) en ninfas que adquirieron a *S. kunkelii* comparativamente con ninfas que adquirieron a *S. kunkelii* y luego fueron asperjadas con *M. anisopliae* (Cuadro 2). Resultados similares fueron encontrados para adultos, debido a que la presencia de *S. kunkelii* fue similar ($P = 0.85$) para adultos que adquirieron a *S. kunkelii* comparativamente con adultos que adquirieron a *S. kunkelii* y luego fueron asperjados con *M. anisopliae* (Cuadro 2).

Los resultados anteriores muestran que *M. anisopliae* no tiene un efecto negativo sobre *S. kunkelii* cuando ambos viven en ninfas y adultos de *D. maidis*. Aunque en este estudio no se encontró algún efecto negativo sobre *S. kunkelii*, en otras investigaciones se reportó que una especie de hongo (*Trichoderma longibrachiatum*) presenta varios péptidos que tienen actividad bactericida contra espiroplasmas, debido a que alteran la permeabilidad de la membrana (Leclerc *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta donde tenemos conocimiento no existen estudios que hayan investigado la producción de péptidos por el hongo entomopatógeno *M. anisopliae*.

La falta de un efecto negativo de *M. anisopliae* sobre *S. kunkelii* en *D. maidis* podría ser análogo a la falta de un efecto negativo de dichos hongos hacia insectos parasitoides cuando parasitoide y hongo habitan el mismo huésped. Por ejemplo, Pavuk y Williams (2003) reportaron que el hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* no afecta el desarrollo de diferentes especies de parasitoides que se desarrollan en larvas de la especie *Hyphenia scabra* (Lepidoptera: Noctuidae). Además, Tounou *et al.* (2003) encontraron que *M. anisopliae* no afecta el

desarrollo del parasitoide *Anagrus atomus* (Hymenoptera: Mymaridae), cuando ambos habitan en el huésped *Empoasca decipiens* (Hemiptera: Cicadellidae).

Finalmente, la presencia de *S. kunkelii* fue menor ($P = 0.003$) en ninfas que en adultos cuando ambos fueron expuestos a *S. kunkelii* y a *M. anisopliae*, debido a que en ninfas se encontró a *S. kunkelii* en un 38.6%, mientras que en adultos se presento en un 68.6% (Cuadro 2). Sugiriendo que el efecto de *M. anisopliae* sobre *S. kunkelii* puede estar relacionado con el estado de desarrollo del hospedero *D. maidis*.

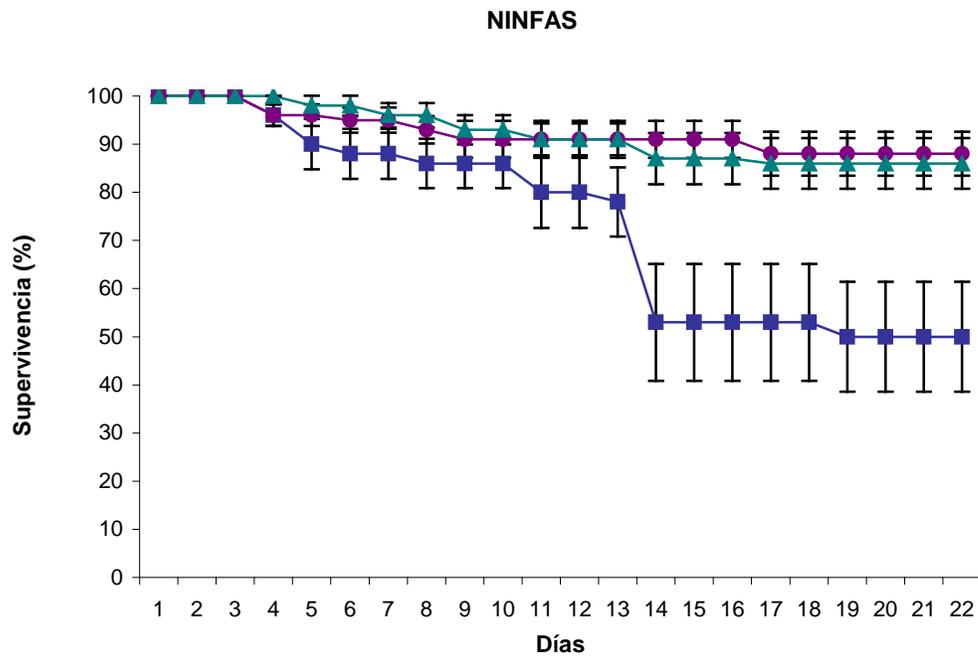


Figura 11. Porcentajes de supervivencia en ninfas de *Dalbulus maidis*. Ninfas con *S. kunkelii* y hongo (■); ninfas con *S. kunkelii* (●); ninfas sanas (▲).

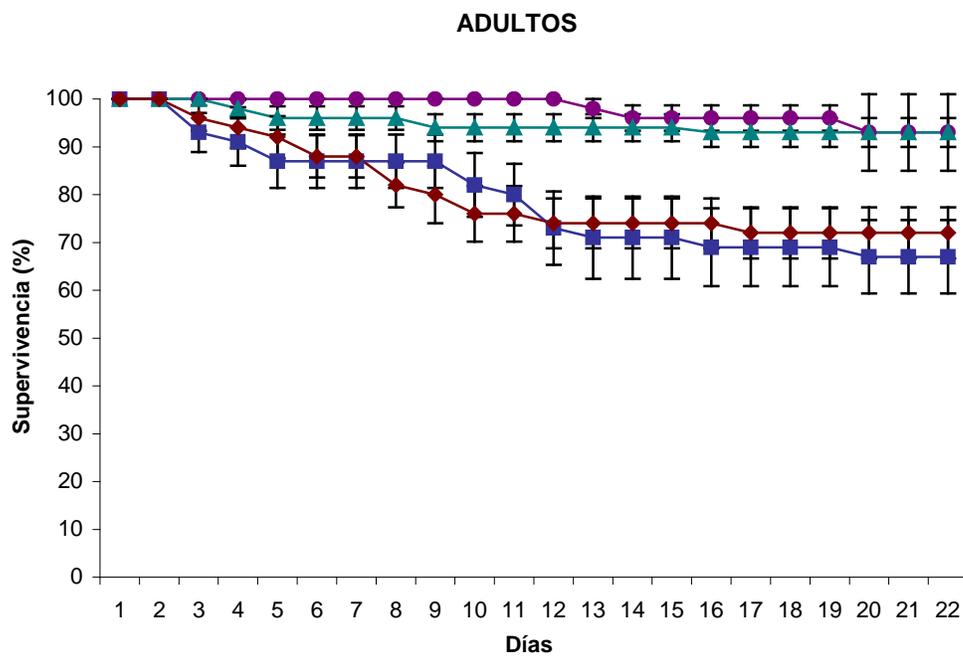


Figura 12. Porcentajes de supervivencia en adultos de *Dalbulus maidis*. Adultos con *S. kunkelii* y hongo (■); adultos con *S. kunkelii* (●); adultos sanos (▲); adultos con hongo (◇).



Figura 13. Adulto de *Dalbulus maidis* muerto por la infección del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.

Cuadro 2. Identificación por PCR de la bacteria *S. kunkelii* en ninfas y adultos de *D. maidis* con y sin el hongo *M. anisopliae*. n = número total de individuos procesados.

Chicharritas	Tratamientos	n	Presencia de la bacteria	Prueba exacta de Fisher
<i>Dalbulus maidis</i> NINFAS	bacteria	38	60.52%	$P = 0.07$
	bacteria + hongo	44	38.6%	
<i>Dalbulus maidis</i> ADULTOS	bacteria	86	66%	$P = 0.85$
	bacteria + hongo	51	68.6%	

CAPITULO III

***Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae), en su vector *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) durante la estación seca en el centro de México.**

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 esta 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* esta adentro del insecto. El objetivo 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).

HIPÓTESIS

La bacteria *S. kunkelii* permanece en la chicharrita del maíz *D. maidis* en periodos de estación seca.

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 (Cuadro 3). Los adultos capturados fueron transportados vivos al laboratorio, donde fueron identificados y almacenados a -80°C en un ultracongelador (Nuairé – NU6514) para posteriormente determinar individualmente la presencia de *S. kunkelii* con la técnica de PCR (Fig. 14).

Metodología

Al igual que en los capítulos anteriores la extracción de ADN se llevó a cabo con el protocolo de Aljanabi y Martínez (1997); y para realizar la amplificación del ADN de la bacteria también se utilizó la técnica de PCR, descrita por Barros *et al.* (2001), ambas técnicas se describieron en el capítulo I.

Además de haber procesado individualmente los especímenes seleccionados de los tres experimentos 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.

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 4 y 5). 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 4). 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 5). 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

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

Cuadro 4. 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 (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 5. 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				
	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 (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	*	*	*	*	*	*

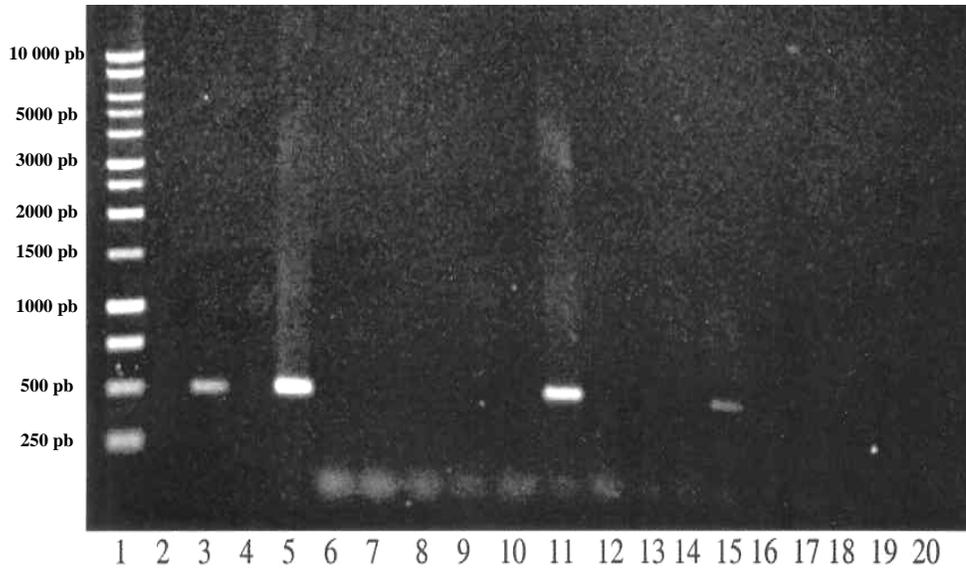


Figura 14. Amplificación por PCR de la secuencia del gen *spiralin* de la bacteria *Spiroplasma kunkelii*. Carril 1, Marcador de ADN 1 kb (Promega). Carril 2, agua como control negativo. Carril 3, ADN purificado del espiroplasma como control positivo. Carril 4, chicharrita sana como control negativo. Carril 5, chicharrita infectada (inyectada) como control positivo. Carriles 6-20, ADN de insectos colectados durante la estación seca. Carriles 11 y 15, chicharritas con presencia de la bacteria.

LITERATURA CITADA

- Alvizatos** AS and Markham PG. 1986. Multiplication of corn stunt spiroplasma in *Dalbulus maidis* and transmission in vitro, following injection. *Annals Applied Biology* **108**: 545-554.
- 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.
- Arango** GL, Torres C y Lapionte SL. 1994. Patogenicidad de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre huevos y ninfas de *Aeneolamia varia* (Fabricius) (Homoptera: Cercopidae). *Revista Colombiana de Entomología* **20**: 43-46.
- Bai** X and Hogenhout SA. 2002. A genome sequence survey of the mollicute corn stunt spiroplasma *Spiroplasma kunkelii*. *FEMS Microbiology Letters* **210**: 7-17.
- 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.

- Berlanga-Padilla AM.** 2002. Manejo y conservación de hongos entomopatógenos. *En Entrenamiento en producción masiva de hongo entomopatógenos.* Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Colima, México. 23 pp.
- Christiansen-Weniger P, Powell C and Hardie J.** 1998. Plant virus and parasitoid interactions in a shared insect vector/host. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **86**: 205-213.
- Davis RE.** 1973. Ocurrance 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.
- Escribano A, Williams T, Goulson D, Cave RD, Chapman JW and Caballero P.** 2001. Consequences of interspecific competition on the virulence and genetic composition of a nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera frugiperda* larvae parasitized by *Chelonus insularis*. *Biocontrol science and technology* **11**: 649-662.

- Foissac X**, Bové JM and Saillard C. 1997. Sequence analysis of *Spiroplasma phoeniceum* and *Spiroplasma kunkelii* spiralin genes and comparison with other spiralin genes. *Current Microbiology* **35**: 240-243.
- Ibarra-Aparicio G**, Moya-Raygoza G y Berlanga-Padilla A. (en prensa). Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (DeLong & Wolcott 1923) (Hemiptera: Cicadellidae). *Folia Entomológica Mexicana*.
- Kathirithamby J** and Moya-Raygoza G. 2000. *Halictophagus naulti* sp.n. (Strepsiptera: Halictophagidae), a new species parasitic in the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) from Mexico. *Annals of the Entomological Society of America* **93**: 1039-1044.
- 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.
- 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.
- Leclerc G**, Goulard C, Prigent Y, Bodo B, Wroblewski and Rebuffat S. 2001. Sequences and Antimycoplasmic Properties of Longibrachins LGB II and LGB III, Two Novel 20-Residue Peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Natural Products* **64**: 164-170.
- Lecuona RE**, Papierok B and Riba G. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbial de insectos plaga. Argentina 338 pp.

- Li X** and **Webb BA**. 1994. Apparent functional role of cysteine-rich polydnavirus protein in suppression of the insect cellular immune response. *Journal of Virology* **86**: 7482-7489.
- Luckhart S** and **Webb BA**. 1996. Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression. *Development and Comparative Immunology* **20**: 1-21.
- Moya-Raygoza G** and **Trujillo-Arriaga J**. 1993. Dryinid (Hym.: Dryinidae) parasitoids of *Dalbulus* leafhopper (Hom.: Cicadellidae) in Mexico. *Entomophaga* **38**: 41-49.
- Moya-Raygoza G**, **Nault LR**, **Hogehout 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.
- Moya-Raygoza G**, **Kathirithamby J** and **Larsen KJ**. 2004. Dry season parasitoids of adult corn leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) on irrigated maize in Mexico. *The Canadian Entomologist* **136**: 119-127.
- Nault LR**. 1980. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. *Phytopathology* **70**: 709-712.
- 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.
- Nault LR.** 1993. Evolución de una plaga de insectos: el maíz y las chicharritas. Un estudio de caso. Biología, Ecología y Conservación del genero *Zea* (compilador Bruce F. Benz), Universidad de Guadalajara. pp: 179-202.
- Oliver KM, Russell JA, Moran NA and Hunter MS.** 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasp. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **100**: 1803-1807.
- Pavuk DM and Williams CE.** 2003. Simultaneous parasitism of field-collected green cloverworm, *Hypena scabra* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae by endoparasitoids and an entomopathogenic fungus. *Great Lakes Entomologist* **36**: 122-128.
- Purcell AH and Nault LR.** 1991. Interactions among plant pathogenic prokaryotes, plants, and insect vectors. *In: Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions.* Barbosa P, Krischik VA, and Jones CG (editors). pp. 383-405. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Ríos-Reyes AV y Moya-Raygoza G.** 2004. Ciclo biológico, parasitismo y depredación de *Gonatopus bartletti* Olmi, 1984 (Hymenoptera: Dryinidae), un enemigo natural de la chicharrita *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae). *Folia Entomológica Mexicana* **43**: 249-255.

- Sambrook** J, Fritsh EF and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. USA.
- StatSoft**, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.
- 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.
- Tounou** AK, Agboka K, Poehling HM, Raupach K, Langewald J, Zimmermann G and Borgemeister C. 2003. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of the green Leafhopper *Empoasca decipiens* (Homoptera: Cicadellidae) and potencial side effects on the egg parasitoid *Anagrus atomus* (Hymenoptera: Mymaridae). *Biocontrol Science and Technology* **13**: 715-728.
- 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.
- Vega** FE and Barbosa P. 1990. *Gonatopus bartletti* Olmi (Hymenoptera: Dryinidae) in Mexico: A previously unreported parasitoid of the corn leafhopper *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) and the mexican corn leafhopper *Dalbulus elimatus* (Ball) (Homoptera: Cicadellidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* **92**: 461-464.

- Vega** FE, Barbosa P and Perez AP. 1991. *Eudorylas* (*Metadorylas*) sp. (Diptera: Pipunculidae): a previously unreported parasitoid of *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) and *Dalbulus elimatus* (Ball) (Homoptera: Cicadellidae). *The Canadian Entomologist* **123**: 241-242.
- Webb** BA and Luckhart S. 1994. Evidence for an early immunosuppressive role for related *Campoletis sonorensis* venom and ovarian proteins in *Heliothis virescens*. *Archives of insect Biochemistry and Physiology* **26**: 147-163.
- Webb** BA and Luckhart S. 1996. Factors mediating short and long-term immune suppression in a parasitized insect. *Journal of Insect Physiology* **42**: 33-40.
- Zimmermann** G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potencial as a biocontrol agent. *Pestic. Sci.* **37**: 375-379.