



*Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados*



**CARACTERIZACIÓN DEL “ACHAPARRAMIENTO
DEL MAÍZ” CAUSADO POR *Spiroplasma kunkelii* Y
DETECCIÓN DE UN NUEVO VECTOR
EXPERIMENTAL EN ARGENTINA**

Edgardo José Carloni

Tesis
Para optar al Grado Académico de
Magíster en Ciencias Agropecuarias
Mención: Protección Vegetal

Córdoba, 2010

**CARACTERIZACIÓN DEL “ACHAPARRAMIENTO DEL
MAÍZ” CAUSADO POR *Spiroplasma kunkelii* Y DETECCIÓN
DE UN NUEVO VECTOR EXPERIMENTAL EN ARGENTINA**

Ing. Agr. Edgardo José Carloni

Comisión Asesora de Tesis

Directora: Dra. Irma Graciela Laguna

Codirectora: Ing. Agr. Dra. María de la Paz Giménez Pecci

Asesores: Ing. Agr. MSc. Vilma Mazzuferi

Tribunal Examinador de Tesis

Ing. Agr. Dra. Adriana Marinelli

Ing. Agr. (Mgter) Vilma Mazzuferi

Ing. Agr. (M.Sc.) Julio Muñoz

Presentación Formal Académica

2 de agosto de 2010

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue posible gracias a la colaboración de las siguientes personas: Irma Graciela Laguna, María de la Paz Giménez Pecci, Vilma Mazzuferi; Pablo Carpane, Eduardo Virla, Susana Paradell, Claudia Nome, Fabián Giolitti, Fabiana Guzmán, Laura Caro, Karina Grunberg, Sabrina Griffa, Andrea Ribotta, Evagelina Argüello, Matías Santa, Juan Argüello, Claudio Nikolaus, Cinthia Conforto, Gonzalo Montiel, Martín Roggero, Emiliano Garzón, Hugo Bianchi, Ramón Suasnabar, Ramón Luna, autoridades del Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal, hermanos, mamá, Vani y a todas las demás personas queridas que compartieron está historia.

Abstract

Corn stunt caused by *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) is potentially one of the most severe diseases of maize (*Zea mays* L.) in tropical and subtropical areas of the American continent. *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) is considered the most important vector of the pathogen due to its transmission efficiency and wide distribution. In Argentina, since the disease appearance in the 90's, the endemic presence has been detected in subtropical areas and a gradual spread towards the maize growing region has been suggested. The aim of the present work was to determine epidemiological aspects of the disease in the maize growing area of Argentina. The results confirmed the presence of *S. kunkelii* and its vector in the central agricultural area of the country. Within this region, the highest numbers of *D. maidis* have been detected in the transition zone between temperate and subtropical climates, along with the highest disease incidence levels. The presence of a new experimental vector of *S. kunkelii*, the cicadellid *Exitianus obscurinervis*, is demonstrated, since it acquires spiroplasmas from infected maize plants and transmits them to healthy plants. The presence of *D. maidis* throughout the year in subtropical areas was confirmed and insect carriers of *S. kunkelii* were detected in spring, summer and autumn. Mean percentage of carrie and inoculative *D. maidis* vector of *S. kunkelii* was 1.78% and 0.70%, respectively. Females and males of inoculative *D. maidis* are found in similar proportions, suggesting that both sexes can play similar roles in transmission and spread of *S. kunkelii*. The fact that the main vector was not detected in some plots of the temperate area affected by corn stunt suggests the presence of another species besides *D. maidis* as a natural vector of *S. kunkelii* in Argentina. Detecting *E. obscurinervis* as vector of *S. kunkelii* requires further knowledge of the latter species, since it is widely distributed in areas where the main vector species has not been observed.

Key words: *Mollicutes*, *Dalbulus maidis*, corn leafhopper, *Cicadellidae*, *Exitianus sp.*

Resumen

El achaparramiento del maíz causado por *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) es potencialmente una de las enfermedades más serias del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en áreas tropicales y subtropicales del continente Americano. Por su eficiencia en la transmisión y su amplia distribución, *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) es considerado el vector más importante del patógeno. En Argentina, desde su aparición en la década del 90 se ha determinado la presencia endémica de la enfermedad en áreas subtropicales y se sugirió un paulatino avance hacia la región maicera del centro del país. El objetivo del presente trabajo de tesis es determinar aspectos epidemiológicos de la enfermedad en el área maicera Argentina. Los resultados confirman la presencia de *S. kunkelii* y de su vector en la región agrícola central del país. Dentro de esta región, se detecta mayor cantidad de *D. maidis* en el área de transición del clima templado al subtropical, junto a mayores niveles de incidencia de la enfermedad. Se demuestra la existencia de un nuevo vector experimental de *S. kunkelii*, el cicadélido *Exitianus obscurinervis*, ya que adquiere espiroplasmas desde plantas de maíz infectadas y lo transmite a plantas sanas. Se confirma la presencia de *D. maidis* durante todo el año en áreas subtropicales y se detectan insectos portadores con *S. kunkelii* en primavera, verano y otoño. El porcentaje promedio de *D. maidis* portadores e inoculativos de *S. kunkelii* fue del 1,78% y 0,70%, respectivamente. Hembras y machos de *D. maidis* inoculativos se encuentran en proporciones similares lo que sugiere que ambos sexos pueden tener roles similares en la transmisión y diseminación de *S. kunkelii*. La no detección del principal vector en algunos lotes del área templada afectados por achaparramiento del maíz permite suponer la presencia de otra especie diferente a *D. maidis* como vector natural de *S. kunkelii* en Argentina. La detección de *E. obscurinervis* como vector de *S. kunkelii* requiere profundizar el conocimiento sobre esta especie, ya que está ampliamente distribuida en áreas donde no ha sido observada la principal especie vectora.

Palabras claves: *Mollicutes*, *Dalbulus maidis*, Chicharrita del maíz, *Cicadellidae*, *Exitianus sp.*

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1 _____	1
INTRODUCCIÓN GENERAL _____	1
HIPÓTESIS _____	9
OBJETIVO GENERAL _____	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	9
CAPÍTULO 2 _____	15
PRESENCIA E INCIDENCIA DE <i>Spiroplasma kunkelii</i> Y DE SU VECTOR <i>Dalbulus maidis</i> EN LA REGIÓN AGRÍCOLA CENTRAL DE ARGENTINA _____	15
INTRODUCCIÓN _____	15
MATERIAL Y MÉTODOS _____	17
2.1.- Presencia, prevalencia e incidencia de la enfermedad en la región agrícola central de Argentina _____	17
2.2.- Presencia y abundancia de <i>Dalbulus maidis</i> en la región agrícola central de Argentina _____	20
RESULTADOS _____	21
2.1.- Presencia, prevalencia e incidencia de la enfermedad en la región agrícola central de Argentina _____	21
2.2.- Presencia y abundancia de <i>Dalbulus maidis</i> en la región agrícola central de Argentina _____	27
DISCUSIÓN _____	31
CONCLUSIÓN _____	35
BIBLIOGRAFÍA _____	36
CAPÍTULO 3 _____	39
ENSAYOS DE TRANSMISIÓN DE <i>Spiroplasma kunkelii</i> CON CICADÉLIDOS ENDÉMICOS DE ARGENTINA _____	39
INTRODUCCIÓN _____	39
MATERIAL Y MÉTODOS _____	42
3.1.- Obtención del vector y del aislamiento del patógeno _____	42
3.2.- Ensayos de transmisión con potenciales vectores _____	44
3.2.1.- Ensayos de transmisión con cicadélidos colectados a campo _	44
3.2.2.- Ensayos de transmisión con individuos de <i>Exitianus obscurinervis</i> criados en condiciones controladas _____	45

3.3.- Evaluación de síntomas y detección del patógeno en plantas e insectos	46
RESULTADOS	48
3.2.- Ensayos de transmisión con potenciales vectores	48
3.2.1.- Ensayos de transmisión con cicadélidos colectados a campo	48
3.2.2.- Ensayos de transmisión con individuos de <i>Exitianus obscurinervis</i> criados en condiciones controladas	49
3.3.- Evaluación de síntomas y detección del patógeno en plantas e insectos	50
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIÓN	59
BIBLIOGRAFÍA	60
CAPÍTULO 4	64
VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA TASA PORCENTUAL DE <i>Dalbulus maidis</i> PORTADORES E INFECTIVOS DE <i>Spiroplasma kunkelii</i> EN UNA POBLACIÓN DE TUCUMÁN	64
INTRODUCCIÓN	64
MATERIAL Y MÉTODOS	66
4.1.- Muestreo de insectos	66
4.2.- Porcentaje de insectos infectivos de <i>S. kunkelii</i>	67
4.3.- Porcentaje de insectos portadores de <i>S. kunkelii</i>	68
4.4.- Análisis estadístico	68
4.1.- Muestreo de insectos	69
4.2.- Porcentaje de insectos infectivos de <i>S. kunkelii</i>	70
4.3.- Porcentaje de insectos portadores de <i>S. kunkelii</i>	71
DISCUSIÓN	74
CONCLUSIÓN	77
BIBLIOGRAFÍA	78
CAPÍTULO 5	81
CONCLUSIONES GENERALES	81

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.1. <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) en medio de cultivo líquido, mostrado con la óptica de campo oscuro.	3
Fig. 1.2. Síntomas típicos del “achaparramiento del maíz” causados por <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) en plantas de maíz (<i>Zea mays</i> L.) Cv. Pop Zélia en invernadero.	4
Fig. 1.3. Adulto de <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott), vector de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb).	5
Fig. 1.4. Síntomas de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) en planta de teosinte (<i>Zea</i> sp.) obtenidos mediante transmisiones experimentales con <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) en invernadero.	7
Fig. 2.1. Ubicación geográfica de las localidades donde se muestrearon lotes de maíz para detectar la presencia de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe en dos campañas agrícolas.	18
Fig. 2.2. Ubicación geográfica de las localidades donde se muestrearon lotes para detectar la presencia de <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe en la región agrícola central del país.	20
Fig. 2.3. Incidencia promedio de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) en provincias de la región central de Argentina durante las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07.	24
Fig. 2.4. Valores máximos de incidencia de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) en lotes de maíz de diferentes provincias de la región central de Argentina durante las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07.	25
Fig. 2.5. Distribución espacial de los valores de incidencia de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) en lotes de maíz durante las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07 en las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires.	26
Fig. 2.6. Distribución de lotes afectados con <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. A: campaña agrícola 2005/06. B: campaña agrícola 2006/07.	27
Fig. 2.7. Localidades donde se detectó la presencia de <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe de la región agrícola central de Argentina entre febrero de 2006 y abril de 2007.	28
Fig. 2.8. Distribución espacial del número de <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) recolectados por lote en las localidades monitoreadas de las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires entre febrero de 2006 y abril de 2007.	31
Fig. 3.1. Obtención y manutención del aislamiento de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) mediante transmisión con <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) en invernadero.	43
Fig. 3.2. Obtención de colonias sanas de <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) en invernadero.	44

Fig. 3.3. Adulto de <i>Exitianus obscurinervis</i> (Stål, 1859) alimentándose en planta de maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	49
Fig. 3.4. Síntomas del achaparramiento del maíz causados por <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) en plantas de maíz (<i>Zea mays</i> L.) cv. Pop Zélia, obtenidos mediante transmisiones experimentales con <i>Exitianus obscurinervis</i> (Stål, 1859). A-C) típicas estrías cloróticas partiendo de la base de las hojas. D) planta con síntomas severos de achaparramiento. E-G) detalle (flecha) de: E) acortamiento de entrenudos, F) acartuchamiento de hojas, G) corte longitudinal y H) bordes recortados.	51
Fig. 3.5. Identificación y detección de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) en <i>Exitianus obscurinervis</i> (Stål, 1859) utilizados como vectores experimentales. Electroforesis en gel de agarosa 1,4 %. Producto de PCR (500 pb) obtenidos con par de iniciadores específicos (CSSF2/R6) para <i>S. kunkelii</i> . M: Marcador de peso molecular. TS: Testigo sano (ADN de <i>E. obscurinervis</i> sano). TE: Testigo enfermo (Planta de maíz experimentalmente inoculada con el aislamiento T1). Calles 1-7: ADN derivado de 7 muestras de <i>E. obscurinervis</i> (3 insectos/muestra) experimentalmente inoculados con <i>S. kunkelii</i>	52
Fig. 3.6. Técnica de inmunomarcación con oro usando antisuero específico para <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb). Confirmación de <i>S. kunkelii</i> en las glándulas salivales de <i>Exitianus obscurinervis</i> (Stål, 1859). A. Los círculos indican las partículas de oro sobre los espiroplasmas. Secciones ultrafinas incubadas con anticuerpo policlonal para <i>S. kunkelii</i> . B. Detalle de la figura A (flecha). Barra = 1µm y 200 nm en figura A y B, respectivamente.	53
Fig. 3.7. A: Vista general de glándulas salivares de <i>Exitianus obscurinervis</i> (Stål, 1859) infectadas con <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb). B: Detalle de A, las flechas indican espiroplasmas. Espiroplasma individual dentro de vesículas (C) y rodeados por una simple membrana (D). Barra = 5µm y 1µm en figura A y B, respectivamente.....	54
Fig. 4.1. Proporción de sexos en adultos de <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) colectados en la localidad El Manantial, Tucumán, entre agosto del 2004 y enero de 2007.....	69
Fig. 4.2. <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) analizados mediante PCR para determinar la presencia de <i>S. kunkelii</i> (Whitcomb) entre agosto de 2004 y enero de 2007 en El Manantial, Tucumán.	71
Fig. 4.3. Adultos machos y hembras de <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) analizados mediante la técnica PCR para determinar la presencia de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) entre agosto de 2004 y enero de 2007 en El Manantial, Tucumán.....	72
Fig. 4.4. Gel de agarosa (1,4% p/v) donde se muestra la banda del producto de amplificación de PCR (500 pb) obtenida con iniciadores específicos para <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb). Calle 1-20. ADN de <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) colectado a campo de la provincia de Tucumán. Ts. Control sano. Te. Control enfermo. M. Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Promega Corp.)	72

Fig. 4.5. *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) portadores de *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) colectados durante agosto de 2004 y enero de 2007 en El Manantial, Tucumán..... 73

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Presencia e incidencia de achaparramiento del maíz causado por <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Witcomb) detectado por DAS-ELISA en localidades de la región central de Argentina durante la campaña agrícola 2005/06.....	22
Tabla 2.2. Presencia e incidencia de achaparramiento del maíz causado por <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Witcomb) detectado por DAS-ELISA en localidades de la región central de Argentina durante la campaña agrícola 2006/07.....	23
Tabla 2.3. Prevalencia de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Witcomb) en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe en dos campañas agrícolas.....	26
Tabla 2.4. Presencia de <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) en localidades de la región central de Argentina en los monitoreos realizados entre los meses de febrero de 2006 y abril de 2007.	29
Tabla 2.5. Presencia de <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) en localidades de la región central de Argentina en los monitoreos realizados entre los meses de febrero de 2006 y abril de 2007.	30
Tabla 3.1. Transmisiones experimentales de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) bajo condiciones controladas, utilizando cicadélidos recolectados a campo en los años 2005 y 2006.	49
Tabla 3.2. Detección de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) en plantas de maíz (<i>Zea mays</i> L.) cv. Pop Zélia transmitidas bajo condiciones controladas utilizándose una densidad de 3 individuos de <i>Exitianus obscurinervis</i> (Stål, 1859) como vectores.....	55
Tabla 4.1. <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott) analizados para determinar el número de insectos portadores (PCR) e infectivos (DAS-ELISA) de <i>Spiroplasma kunkelii</i> (Whitcomb) durante 4 estaciones del año de una población de insectos de El Manantial, Tucumán.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	por ciento
'	minuto
''	segundo
μl	microlitro
cm	centímetro
CTAB	Cyl Trimethyl Ammonium Bromide
cv.	cultivar
DAS-ELISA	Double Antibody Sándwich-ELISA
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
g	gramo
h	hora
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
kV	kilivoltio
LS	latitud sur
lts.	litros
M	molar
m.s.n.m.	metro sobre nivel del mar
min.	minutos
ml	mililitro
mm	milímetros
N°	número
ng	nanogramo
nm	nanómetros
°	grado
°C	grado centígrado
p/v	peso en volumen
pb	pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PTA-ELISA	Plate Trapping Antigen-ELISA

rpm revoluciones por minuto
seg.segundos
sp.especie
Tris Tris(hidroximetil)aminometano
U.....unidad
UNLP Universidad Nacional de La Plata
v/v.....volumen en volumen
 μ M.....micromolar
 μ mmicrómetro

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

El maíz “*Zea mays* L.” pertenece a la familia *Poaceae*, subfamilia *Andropogoneae*, tribu *Maydeae* y es la especie agronómicamente más importante del género. En nuestro país constituye uno de los cultivos de mayor importancia. Entre las campañas agrícolas 1990/91 y 2006/07, la producción nacional demostró un constante crecimiento, pasando de 7,7 millones de toneladas (campaña agrícola 1990/91) a 21,8 millones en la campaña agrícola 2006/07, ocupando el segundo lugar entre los países exportadores del mundo (MAGyP, 2009; FAO, 2009). Los importantes avances en cuanto al mejoramiento genético e incorporación de nuevas tecnologías y prácticas culturales han permitido elevar su potencial de rendimiento. Sin embargo, es un cultivo que requiere del uso de tecnología intensiva y su costo resulta elevado. Es por eso que los factores que reducen el potencial de rendimiento, tales como las enfermedades, pueden ocasionar perjuicios económicos significativos para los productores.

En América el maíz es cultivado en ambos hemisferios, alcanzando los 58° de latitud norte en Canadá y los 40° de latitud sur de Argentina (Paliwal, 2001). En nuestro país, se estima que el área cultivada alcanza aproximadamente 3,2 millones de hectáreas, de las cuales el 83% de la superficie se encuentra en las provincias de Córdoba, Buenos Aires y Santa Fe (MAGyP, 2009). El 17% restante del área maicera está en Entre Ríos, La Pampa, Santiago del Estero, Chaco y otras provincias del norte Argentino.

El “achaparramiento del maíz” o “corn stunt disease” es potencialmente una de las enfermedades más serias del cultivo de maíz, y puede ser un factor limitante al causar pérdidas parciales o totales en la producción en las zonas afectadas por esta enfermedad (Bradfute *et al.*, 1981; Hruska *et al.*, 1996; Oliveira

et al., 1998). En Brasil se la detectó en la década del 70, considerada de importancia secundaria al causar algunos perjuicios en las siembras tardías del cultivo (Kitajima y Costa, 1983). En la actualidad, los problemas causados por el achaparramiento se han incrementado en ese país. Se observan lotes afectados con el 70% de incidencia y está mencionada entre las enfermedades más importantes del maíz debido a las pérdidas que ocasiona (Massola Júnior *et al.*, 1999b; Oliveira *et al.*, 2002). Las estimaciones de pérdidas económicas durante la campaña 2001/02 fueron cercanas a 16,5 millones de dólares en cultivos de maíz de invierno “safrinha” (Oliveira *et al.*, 2003).

El achaparramiento del maíz se ha encontrado en toda el área neotropical de América, que abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina, siendo citado en Estados Unidos (Gordon *et al.*, 1985; Overman *et al.*, 1992; Summers *et al.*, 2004), México (Bajet y Renfro, 1989), Nicaragua (Hruska y Gomez Peralta, 1997), Colombia (Varón de Agudelo *et al.*, 2001), Perú (Nault *et al.*, 1979), Venezuela (Lastra y Trujillo, 1976), El Salvador (Vandermeer y Power, 1990), Brasil (Oliveira *et al.*, 1998), Paraguay (Lezcano y Machado, 1997) y Argentina (Lenardon *et al.*, 1992).

Uno de los agentes causales del achaparramiento de maíz es mollicute *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb, el que se encuentra en áreas tropicales y subtropicales del continente Americano (Whitcomb *et al.*, 1986). Es un organismo procarionte sin pared celular y de las 50 especies de espiroplasmas conocidas (Bové y Garnier, 2002), es una de las tres especies fitopatógenas, junto con *S. citri* y *S. phoeniceum* (Fletcher *et al.*, 2006). Su forma es helicoidal (Fig. 1.1), variando de 100 a 150 nm de diámetro y 300 a 1000 nm de longitud, y/o filamentos no helicoidales, pleomórficos con diámetros de 200 a 800 nm (Whitcomb *et al.*, 1986; Özbek *et al.*, 2003; Ammar y Hogenhout, 2005). El primer organismo con morfología helicoidal asociado a plantas de maíz con “Corn stunt” fue observado por Davis *et al.* (1972). Un año más tarde Davis y Worley (1973) lo denominan como “Spiroplasma”, un término posteriormente adoptado como nombre del género. Taxonómicamente el género se ubica en la Clase *Mollicutes*, Orden

Entomoplasmatales, familia Spiroplasmataceae, Grupo I-3 (Gasparich *et al.*, 2004, Brown *et al.*, 2007).



Fig. 1.1. *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) en medio de cultivo líquido, mostrado con la óptica de campo oscuro.

En maíz, *S. kunkelii* puede encontrarse en forma aislada o en asociación con el virus *Maize rayado fino virus* (MRFV) y/o con Maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) [*Candidatus* (Ca.), Género Phytoplasma], otra bacteria sin pared celular de la clase *Mollicutes* (Nault *et al.*, 1979; Bradfute *et al.*, 1981; Oliveira *et al.*, 2002; Hogenhout *et al.*, 2008). Los tres patógenos, solos o en combinación causan el complejo denominado “corn stunt”, generalmente nombrada la enfermedad en América como “achaparramiento” (Hruska *et al.*, 1996). Estos patógenos presentan un vector común; *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott), el que los transmite de manera persistente propagativa (Nault, 1980; Nault *et al.*, 1980). Los primeros relatos sobre la ocurrencia del corn stunt fueron realizados en la década del 40 en Texas (USA), siendo atribuida a una enfermedad de origen viral (Alstatt (1945, citado de Fletcher *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios posteriores permitieron esclarecer la etiología de esta enfermedad (Whitcomb *et al.*, 1986).

Los síntomas típicos de achaparramiento causado por *S. kunkelii* en plantas de maíz son predominantemente del tipo clorosis foliar (Fig. 1.2). Comienzan después de 3 a 5 semanas de infección dependiendo de la temperatura, y se manifiestan como pequeñas estrías cloróticas en la base de las láminas foliares (Nault, 1980). Las estrías aparecen hasta que toda la hoja se torna clorótica, y posteriormente se extienden a todas las hojas que se desarrollan

subsecuentemente. En algunos casos, las hojas presentan cierto grado de enrojecimiento y bordes recortados. Las plantas sufren un acortamiento de entrenudos, dando lugar al nombre “achaparramiento”.



Fig. 1.2. Síntomas típicos del “achaparramiento del maíz” causados por *Spiroplasma kunkelii* (Witcomb) en plantas de maíz (*Zea mays* L.) Cv. Pop Zélia en invernadero.

La sintomatología típica puede modificarse por la temperatura, el cultivar (Nault, 1980), la presencia conjunta de otros patógenos (Oliveira *et al.*, 2002) y el momento de infección (Massola Júnior *et al.*, 1999b). En ocasiones, las plantas pueden desarrollar un crecimiento normal, la clorosis ocurre en forma leve y el enrojecimiento de las hojas superiores es el síntoma más evidente (Massola Júnior *et al.*, 1999a).

Los mayores daños se observan cuando las infecciones se producen en un estado temprano de desarrollo, las plantas desarrollan numerosas mazorcas pequeñas sin granos (Hruska y Gomez Peralta, 1997; Massola Júnior *et al.*, 1999b) y en plantas severamente afectadas la producción es nula (Virla *et al.*, 2004).

S. kunkelii es transmitido de una planta a otra por insectos denominados comúnmente “chicharritas” (Orden Hemiptera: suborden Auchenorrhyncha: familia Cicadellidae), siendo ésta la única forma de transmisión conocida (Fletcher *et al.*, 2006). La chicharrita del maíz, *D. maidis* y su congénere *D. elimatus* Ball, son eficientes vectores (Nault, 1980; Ebbert *et al.*, 2001). Adicionalmente, en condiciones experimentales se logró la transmisión de *S. kunkelii* con *D. guevarai* DeLong, *D. gelbus* DeLong, *D. quinquenotatus* DeLong y Nault, *D. tripsacoides* DeLong y Nault, *Balduus tripsaci* Kramer y Whitcomb (Madden y Nault, 1983), *D. longulus* DeLong (Nault *et al.*, 1984), *Exitianus exitiosus* Uhler, *Graminella nigrifrons* Forbes (Nault, 1980; Bradfute *et al.*, 1981) y *Stirellus bicolor* Van Duzee (Nault, 1980). Sin embargo, por su eficiencia en la transmisión y su amplia distribución, *D. maidis* (Fig. 1.3) es considerado el vector más importante de *S. kunkelii* en América (Madden y Nault, 1983; Nault, 1990; Oliveira *et al.*, 2004).



Fig. 1.3. Adulto de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott), vector de *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb).

Los primeros informes sobre la presencia del achaparramiento de maíz en Argentina fueron documentados durante la campaña agrícola 1990/91 en un área maicera de clima subtropical en las provincias de Santiago del Estero y Tucumán (Lenardon *et al.*, 1992). Desde aquel entonces, la enfermedad continuó expandiéndose gradualmente hacia el sur del país, y en campañas agrícolas sucesivas se detectó en Santiago del Estero, Tucumán, Salta, Catamarca y Chaco (Giménez Pecci *et al.*, 1997). En la actualidad, está presente en la mayoría de las provincias de clima subtropical de Argentina, y fue observada en provincias de

clima templado como Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires (Giménez Pecci *et al.*, 2002a; 2002b; 2003; 2005).

En Argentina, *D. maidis* ha sido mencionada como la única especie presente del género (Virla *et al.*, 1991; Paradell, 1995; Paradell *et al.*, 2001) y Carpane *et al.* (2006) demostraron la capacidad de poblaciones presentes del país en transmitir *S. kunkelii*. En el norte argentino es la especie más abundante en el cultivo de maíz (Paradell *et al.*, 2001; Albarracin *et al.*, 2008). En el área de transición del clima subtropical al templado, ubicada entre los paralelos de latitud 30° S y 31° S, se encontraron individuos de *D. maidis* en las provincias de Córdoba y Santa Fe (Paradell *et al.*, 2001; 2005). En los últimos años se incrementó la superficie afectada por achaparramiento ligada a la presencia del vector, y se registró un paulatino avance hacia el área agrícola central del país (Paradell *et al.*, 2005; Giménez Pecci *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado la importancia de su diseminación.

Al ser *D. maidis* el único vector conocido en Argentina, la presencia de achaparramiento esta directamente relacionada con la de su insecto vector. En varias provincias es común encontrar el vector en lotes donde se observan altos niveles de incidencia de la enfermedad (Giménez Pecci *et al.*, 2002b; Virla *et al.*, 2004). Sin embargo, la presencia de la enfermedad en áreas donde no ha sido hallada *D. maidis*, sugiere que otras especies podrían estar involucrados en la transmisión de *S. kunkelii* (Giménez Pecci *et al.*, 2002a). De este modo, podría ser probable que otros insectos que se observan con relativa frecuencia en el cultivo de maíz o en gramíneas cercanas puedan ser vectores del patógeno (Paradell, 1995; Virla, 2000; Paradell *et al.*, 2001; Paradell *et al.*, 2005; Albarracin *et al.*, 2008). Sin embargo, no se han estudiado otras especies de insectos diferentes a *D. maidis* para determinar si son vectores de *S. kunkelii*.

Estudios conducidos en América del Norte y Central indicaron que tanto *D. maidis* como *S. kunkelii* presentan un rango estrecho de plantas hospedantes, constituidas básicamente por maíz y teosintes (*Zea* sp.) (Fig. 1.4) (Nault, 1990;

Nault, 1980). Además, por ser *D. maidis* un insecto que se alimenta sólo de maíz, y considerando que sus hospedantes coinciden con el centro de origen del insecto, se ha planteado una íntima relación evolutiva entre *Dalbulus* sp. y *Zea* sp. (Triplehorn y Nault, 1985; Nault y DeLong, 1980). En Argentina, los teosintes no crecen naturalmente y eventualmente son encontrados en algunas áreas experimentales. Por lo tanto, no desempeñan un papel importante como reservorio del patógeno y los únicos hospedantes de *S. kunkelii* son los insectos y el maíz.



Fig. 1.4. Síntomas de *Spiroplasma kunkelii* (Witcomb) en planta de teosinte (*Zea* sp.) obtenidos mediante transmisiones experimentales con *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) en invernadero.

Al ser *D. maidis* un especialista del maíz y utilizar como alimento plantas de crecimiento anual (Nault y Madden, 1985), la pérdida del cultivo representa un serio obstáculo dentro de su ciclo de vida (Larsen *et al.*, 1993). Estudios realizados en laboratorio demostraron que los adultos pueden sobrevivir sin maíz con tan solo agua durante dos meses (Larsen *et al.*, 1992). En dicho artículo se sugiere que las chicharritas pasan el invierno únicamente como adulto, invernando en lugares protegidos en las regiones más elevadas de México.

Por otro lado, se ha visto que la sobrevivencia de *D. maidis* no es afectada por la presencia de *S. kunkelii* (Nault *et al.*, 1984; Moya-Raygoza *et al.*, 2007). Es más, en poblaciones de *D. maidis* criadas en laboratorio, se observó que los

individuos infectados con *S. kunkelii* aumentan su supervivencia (Ebbert y Nault, 1994; 2001). Estos autores sugieren que la presencia de *S. kunkelii* en *D. maidis* puede jugar un papel importante en las estrategias que tiene el vector para pasar el invierno.

En la zona subtropical de Argentina, más precisamente en la provincia de Tucumán, el maíz es cultivado solamente durante los meses mas cálidos y el achaparramiento del maíz ha sido observado en varias regiones agroecológicas de esa provincia, con niveles de incidencia de la enfermedad que pueden llegar al 100% (Giménez Pecci *et al.*, 2002a; 2002b). *D. maidis* sobrevive el invierno como adulto y coloniza los cultivos de maíz durante la primavera siguiente (Virla *et al.*, 2003). Sin embargo, se desconoce la tasa porcentual de individuos portadores e inoculativos de *S. kunkelii* que serán inóculo inicial en la campaña agrícola que comienza, factor fundamental en el desarrollo de una epidemia.

Considerando lo mencionado anteriormente, se formula la hipótesis de trabajo, y se plantean los objetivos generales de los cuales se desprenden los objetivos específicos que se detallan a continuación. Los conocimientos surgidos a partir del cumplimiento de los objetivos propuestos permitirán definir la magnitud del problema del achaparramiento del maíz causado por *S. kunkelii* y conocer aspectos epidemiológicos en el país, constituyendo componentes básicos para formular apropiadas pautas de manejo en el futuro.

HIPÓTESIS

La distribución y abundancia estacional de *Dalbulus maidis* como fuente de inóculo y otros cicadélidos transmisores determinan la presencia e incidencia del achaparramiento del maíz causado por *S. kunkelii* en el área maicera Argentina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar presencia e incidencia del achaparramiento del maíz causado por *S. kunkelii*, distribución y abundancia estacional de su vector *Dalbulus maidis* como fuente de inóculo y detección de nuevos cicadélidos transmisores en el área maicera Argentina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Determinar la presencia e incidencia del achaparramiento del maíz causado por *S. kunkelii* y la distribución y abundancia del vector *D. maidis* en la región agrícola central de Argentina.

2.- Determinar la existencia de cicadélidos diferentes a *D. maidis* con capacidad de transmitir *S. kunkelii* en diferentes zonas agrícolas productoras de maíz.

3.- Determinar el porcentaje de *D. maidis* portadores e infectivos de *S. kunkelii* en distintas estaciones del año en la provincia de Tucumán.

BIBLIOGRAFÍA

- Albarracin E. L., Paradell S. and Virla E. G. 2008. Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha) associated with maize crops in northwestern Argentina, influence of the sowing date and phenology of their abundance and diversity. *Maydica*. 53(3-4): 289-296.
- Ammar E. D. and Hogenhout S. A. 2005. Immunofluorescence confocal laser scanning microscopy as a reliable method for studying the distribution of mollicutes in vector leafhoppers (Cicadellidae: Hemiptera) and in host plants. *Annals of the Entomological Society of America*. 98 (6): 820-826.
- Bajet N. B. and Renfro B. L. 1989. Occurrence of corn stunt spiroplasma at different elevations in Mexico. *Plant Disease*. 73: 926-930.
- Bové J. M. and Garnier M. 2002. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Science*. 163: 1083-1098.
- Bradfute O. E., Tsai J. H. and Gordon D. T. 1981. Corn stunt spiroplasma and viruses associated with a maize disease epidemic in Southern Florida. *Plant Disease*. 65: 837-841.
- Brown D. R., Whitcomb R. F. and Bradbury J. M. 2007. Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57: 2703-2719.
- Carpane P., Laguna I. G., Virla E., Paradell S., Murúa L. and Giménez Pecci M, P. 2006. Experimental transmission of corn stunt spiroplasma present in different regions of Argentina. *Maydica*. 51: 461-468.
- Davis R. E., Worley J. F., Whitcomb R. F., Ishijima T. and Steere R. L. 1972. Helical filaments produced by a mycoplasma-like organism associated with corn stunt disease. *Science, New Series* 176 (4034): 521-523.
- Davis R. E. and Worley J. F. 1973. Spiroplasma: Motile, helical microorganism associated with corn stunt disease. *Phytopathology*. 63: 403-408.
- Ebbert M. A. and Nault L. R. 1994. Improved overwintering ability in *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) vectors infected with *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae). *Environmental Entomology*. 23 (3): 634-644.
- Ebbert M. A. and Nault L. R. 2001. Survival in *Dalbulus* leafhopper vectors improves after exposure to maize stunting pathogens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 100: 311-324.
- Ebbert M. A., Jeffers D. P., Harrison N. A. and Nault L. R. 2001. Lack of specificity in the interaction between two maize stunting pathogens and field collected *Dalbulus* leafhoppers. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 101: 49-57.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. Publicado en Internet, disponible en <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=342&lang=es>. Activo enero 2010.
- Fletcher J., Melcher U. and Wayadande A. 2006. The phytopathogenic spiroplasmas. *Prokaryotes*. 4: 905-947.
- Gasparich G. E., Whitcomb R. F., Dodge D., French F. E., J. Glass J. and Williamson D. L. 2004. The genus *Spiroplasma* and its non-helical

- descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 893-918.
- Giménez Pecci M. P., Laguna I. G., Ploper L. D., Remes Lenicov A. M., Paradell S. y Virla E. 1997. Avance del “corn stunt” del maíz en el Norte Argentino. *EAAOC-Avance Agroindustrial*. 31-37.
- Giménez Pecci M. P., Laguna I. G., Avila A. O., Remes Lenicov A.M., Virla E., Borgogno C., Nome C. y Paradell S. 2002a. Difusión del Corn Stunt Spiroplasma del Maíz (*Spiroplasma kunkelii*) y del vector (*Dalbulus maidis*) en la Republica Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*. 105 (1): 1-8.
- Giménez Pecci M. P., Oliveira E., Resende R. O., Laguna I. G., Conci L. R., Avila A., Herrera P., Galdeano E., Virla E. e Nome C. 2002b. Ocorrência de doenças causadas por mollicutes e por vírus em milho nas províncias de Tucumán e de Córdoba na Argentina. *Fitopatologia Brasileira*. 27: 403-407.
- Giménez Pecci M. P., Carpane P. D., Nome C. F., Paradell S., Remes Lenicov A.M., Virla E., y Laguna I. G. 2003. Presencia del Corn stunt spiroplasma y su vector *Dalbulus maidis* en el noroeste Argentino. XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatología. Brazilian Phytopathology Society. 28: S253.
- Giménez Pecci M. P., Laguna I. G., Carpane P., Carloni E. y Murua L. 2005. Dispersión e incidencia del Corn Stunt Spiroplasma en el cultivo de maíz en diferentes áreas de Argentina. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología y III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. 19-22 de abril de 2005. p: 477.
- Gordon D. T., Nault L. R., Gordon N. H., and Heady S. E. 1985. Serological detection of corn stunt spiroplasma and maize rayado fino virus in field-collected *Dalbulus* spp. From Mexico. *Plant Disease*. 69: 108-111.
- Hogenhout S. A., Oshima K., Ammar D., Kakizawa S., Kingdom H. N. and Shigetou N. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*. 9 (4): 1-21.
- Hruska A. J., Gladstone S. M. and Obando R. 1996. Epidemic Roller Coaster: Maize Stunt Disease in Nicaragua. *American Entomologist*. 42 (4): 248-252.
- Hruska A. J. and Gomez Peralta M. 1997. Maize Response to Corn Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) Infestation and Achaparramiento Disease. *Journal of Economic Entomology*. 90(2): 604-610.
- Kitajima, E. W. and Costa A. S. 1983. Diseases of maize caused by viruses and mycoplasmalike organisms in Brazil. En: *Proceedings International Maize Virus Disease Colloquium and Workshop, 2-6 August 1982*. Gordon D. T., Knoke J. K., Nault L. R. and Ritter R. M. (eds.). Ohio State University, Ohio Agricultural Research and Development Center, Wooster. pp. 100-102.
- Larsen K. J., Nault L. R. and Moya-Ragoza G. 1992. Overwintering biology of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae): adult populations and drought hardiness. *Environmental entomology*. 21: 566-577.

- Larsen K. J., Lee R. E. and Nault L. R. 1993. Influence of developmental conditions on cold-hardiness of adult *Dalbulus leafhoppers*: implications for overwintering. *Entomologia experimentalis et applicata*. 67: 99-108.
- Lastra R. y Trujillo G. E. 1976. Enfermedades del maíz en Venezuela causadas por virus y micoplasmas. *Agronomía Tropical*. 26 (5): 441-455.
- Lenardon S. L., Laguna I. G., Gordon D. L., Truol G. A., Gomez G. and Bratfute O. E. 1992. Identification of corn stunt spiroplasma in maize from Argentina. *Plant Disease*. 77 (1): 100.
- Lezcano R. y Machado V. 1997. Fitoplasmas y espiroplasmas de maíz en el Paraguay. *Fitopatologia Brasileira*. 22: 345.
- Madden L. V. and Nault L. R. 1983. Differential Pathogenicity of Corn Stunt Mollicutes to Leafhopper Vectors in *Dalbulus* and *Balbulus* species. *Phytopathology*. 73: 1608-1614.
- MAGyP - Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. 2009. Cultivos. Publicado en Internet, disponible en <http://190.220.136.179/index.php/por-cultivo>. Activo noviembre 2009.
- Massola Júnior N. S., Bedendo I. P., Amorim L. e Lopes J. R. S. 1999a. Quianticação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira*. 24 (2): 136-142.
- Massola Júnior N. S., Bedendo I. P., Amorim L. e Lopes J. R. S. 1999b. Effects of the inoculation time on corn with *Spiroplasma kunkelii* on yield components. *Fitopatologia Brasileira* 24(4): 571-573.
- Moya-Raygoza G., Hogenhout S. A., and Nault L. R. 2007. Habitat of the Corn leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) during the dry (winter) season in Mexico. *Environmental entomology*. 36 (5): 1066-1072.
- Nault L. R., Gordon D. T., Gingery R. E., Bradfute O. E. and Castillo L. 1979. Identification of maize viruses and mollicutes and their potential insect vectors in Peru. *Phytopathology*. 69: 824:828.
- Nault L. R. 1980. Maize Bushy Stunt and Corn Stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. *Phytopathology*. 70: 659-662.
- Nault L. R. and DeLong D. M. 1980. Evidence for Co-evolution of leafhoppers in the genus *Dalbulus* (Cicadellidae: Homoptera) with maize and its ancestors. *Annals of the Entomological Society of America*. 73: 349-353.
- Nault L. R., Gingery R. E. and Gordon D.T. 1980. Leafhopper transmission and host range of maize rayado fino virus. *Phytopathology*. 70: 709-12.
- Nault L. R., Madden L. V., Styer W. E., Triplehorn B. W., Shambaugh G. H. and Heady S. E. 1984. Pathogenicity of corn stunt spiroplasma and maize bushy stunt mycoplasma to their vector, *Dalbulus longulus*. *Phytopathology*. 74: 977-979.
- Nault L. R., and Madden L. V. 1985. Ecological strategies of *Dalbulus* leafhoppers. *Ecological entomology*. 10: 57-63.
- Nault L. R. 1990. Evolution of an insect pest: maize and the corn leafhopper, a case study. *Maydica*. 35: 165-175.
- Oliveira E., Waquil J. M., Fernandes F. T., Paiva E., Resende R. O. & Kitajima E. W. 1998. "Enfezamento pálido" e "enfezamento vermelho" na cultura do milho no Brasil Central. *Fitopatologia Brasileira*. 23: 45-47.

- Oliveira E., Carvalho R. V., Duarte A. P., Andrade R. A., Resende R. O., Oliveira C. M. e Recco P. C. 2002. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 1(2): 38-46.
- Oliveira E., Oliveira Resende R., Giménez Pecci M. P., Laguna I. G., Herrera P. e Cruz I. 2003. Incidencia de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38 (1): 19-25.
- Oliveira C. M., Lopes J. R. S., Dias C. T. S. and Nault L. R. 2004. Influence of latitude and elevation on polymorphism among populations of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Brazil. *Environmental Entomology*. 33: 1192-1199.
- Özbek E., Miller S., Meulia T. and Hogenhout S. 2003. Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. *Journal of invertebrate pathology* 82: 167-175.
- Overman M. A., Ko N. J. and Tsai J. H. 1992. Identification of viruses and mycoplasmas in maize by use of light microscopy. *Plant Disease*. 76: 18-322.
- Paliwal R. P. 2001. Introducción al maíz y su importancia. En. *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*. Publicado en Internet, disponible en <http://www.fao.org/DOCREP/003/X7650S/X7650S00.HTM>. Activo octubre 2009.
- Paradell S. 1995. Especies argentinas de Homópteros Cicadélidos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*. 71:213-234.
- Paradell S. L., Virla E. G. and Toledo A. 2001. Leafhoppers species richness and abundance on corn crops in Argentina (Insecta-Hemiptera-Cicadellidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*. Madrid. 27:465-474.
- Paradell S., Virla E., Remes Lenicov A. M., Giménez Pecci M. P., Catalano M.I. Laguna I. G. e Murúa L. 2005. Cicadélidos sobre cultivos de maíz y la maleza asociada em áreas afectadas por Corn Stunt Spiroplasma (CSS) de las provincias de la zona centro de Argentina (Hemíptera-Auchenorrhyncha). VIII Congreso Nacional de Maíz. Rosario. Argentina. 296-299.
- Summers C. G., Newton A. S. and Opgenorth D. C. 2004. Overwintering of Corn Leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae), and *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) in California's San Joaquin Valley. *Environmental entomology*. 33: 1644-1651.
- Triplehorn B. W. and Nault L. R. 1985. Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the Macrostelini. *Annals of the Entomological Society of America*. 78: 291-315.
- Vandermeer J. and Power A. 1990. An epidemiological model of the corn stunt system in Central America. *Ecological Modelling*. 52: 235-248.
- Varón de Agudelo F., Castillo G. P., Huertas C., León C. y Vanegas H. 2001. Achaparramiento del maíz *Zea mays* L. en el valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana*. 25 (2): 87-91.

- Virla E., Remes Lenicov A. M. M. y Paradell S. 1991. Presencia de *Dalbulus maidis* (Insecta, Homoptera, Cicadellidae) sobre maíz y teosinte en la Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata. 67: 23-30.
- Virla E. 2000. Aportes al conocimiento del complejo de enemigos naturales de *Exitianus obscurinervis* (Insecta- Cicadellidae). Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. 26: 365-375.
- Virla E. G., Paradell S. L. y Diez P. A. 2003. Estudios bioecológicos sobre la chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (Insecta-Cicadellidae) en Tucumán (Argentina). Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. Madrid. 29:17-25.
- Virla E. G., Díaz C. G., Carpane P., Laguna I. G., Ramallo J., Gerónimo Gómez L. y Giménez Pecci M. P. 2004. Evaluación preliminar de la disminución en la producción de maíz causada por el “Corn Stunt Spiroplasma” (CSS) en Tucumán, Argentina. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. 30: 403-413.
- Whitcomb R. F., Chen T. A., Williamson D. L., Liao C., Tully J. G., Bové J. M., Mouches C., Rose D. L., Coan M. E. and Clark T. 1986. *Spiroplasma kunkelii* sp. nov.: Characterization of the etiological agent of corn stunt disease. International Journal of Systematic Bacteriology. 36 (2): 170-178.

CAPÍTULO 2

PRESENCIA E INCIDENCIA DE *Spiroplasma kunkelii* Y DE SU VECTOR *Dalbulus maidis* EN LA REGIÓN AGRÍCOLA CENTRAL DE ARGENTINA

INTRODUCCIÓN

El achaparramiento del maíz es una enfermedad del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) ampliamente distribuida en áreas tropicales y subtropicales del continente Americano, considerada una de las mayores limitantes en la producción de maíz en América (Bradfute *et al.*, 1981; Hruska *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1998). Estudios realizados en Argentina, desde su aparición en la década del 90 (Lenardón *et al.*, 1992) han permitido determinar la presencia endémica de la enfermedad en áreas subtropicales y se sugirió un paulatino avance hacia la región maicera del centro del país (Giménez Pecci *et al.*, 1997; 2002a; 2002b; 2003; 2005). En este capítulo se plantea contribuir al conocimiento de aspectos epidemiológicos tales como presencia e incidencia de la enfermedad y distribución del vector *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) en la región agrícola central del país.

El agente causal de esta enfermedad es *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb (Whitcomb *et al.*, 1986), organismo procarionte sin pared celular, miembro de la Clase *Mollicutes*. Es uno de los tres patógenos del complejo causal de la enfermedad denominada achaparramiento o corn stunt (Hruska *et al.*, 1996). Este complejo se encuentra formado por los mollicutes *S. kunkelii* y Maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) y el virus *Maize rayado fino virus* (MRFV). La transmisión de estos patógenos en plantas está limitada a insectos comúnmente denominadas chicharritas (Hemiptera: Cicadellidae) (Nault, 1980; Nault *et al.*, 1980).

En la naturaleza, los vectores de *S. kunkelii* son *D. maidis* y *D. elimatus* (Ball) y en condiciones experimentales se logró la transmisión del patógeno con varias especies de cicadélidos (Nault, 1980; Madden y Nault, 1983; Ebbert *et al.*, 2001). En Argentina, varios estudios demostraron la presencia de *D. maidis*, siendo esta la única especie presente con capacidad vectora conocida (Virla *et al.*, 1991; Paradell, 1995; Paradell *et al.*, 2001, Carpane *et al.*, 2006).

Los síntomas típicos del achaparramiento del maíz causado por *S. kunkelii* se manifiestan como estrías cloróticas que se inician en la base de las láminas foliares y se extienden hacia el ápice, las plantas tienen crecimiento achaparrado, proliferación de espigas y en ocasiones, enrojecimiento de hojas (Nault, 1980). A campo, es más difícil establecer con certeza la etiología de la enfermedad, ya que los síntomas varían con la temperatura, el genotipo de maíz (Nault, 1980), la presencia conjunta de otros patógenos (Oliveira *et al.*, 2002a) y el momento de infección (Massola Júnior *et al.*, 1999). Cuando las infecciones se producen en el estadio de plántula provocan las mayores reducciones de crecimiento, ya que no se forman espigas o se producen numerosas mazorcas pequeñas y en plantas severamente afectadas la producción es nula (Hruska y Gomez Peralta, 1997).

En Argentina se detectó el achaparramiento del maíz por primera vez en las provincias de Tucumán y Santiago del Estero durante la campaña agrícola 1990/91 (Lenardón *et al.*, 1992). Posteriormente se observó que la enfermedad está presente en otras provincias del norte del país, entre ellas Corrientes, Formosa, Misiones, Santa Fe, Salta, Chaco, Catamarca y Jujuy (Giménez Pecci *et al.*, 1997; 2002a; 2002b; 2003). Los autores observaron una amplia y creciente diseminación de la enfermedad en todas las provincias de clima tropical y subtropical analizadas. Posteriormente, en la campaña agrícola 2003/04 se observaron algunos lotes con achaparramiento del maíz en las provincias de Córdoba y Buenos Aires y se alertó sobre la presencia de la enfermedad y el vector *D. maidis* en la región agrícola central de Argentina (Giménez Pecci *et al.*, 2005; Paradell *et al.*, 2005).

D. maidis se encuentra regularmente distribuido en localidades ubicadas al norte del paralelo de latitud 30° S del país y se considera que es endémico en el área subtropical (Paradell 1995; Paradell *et al.*, 2001; Giménez Pecci *et al.*, 2002a; 2003; Albarracin *et al.*, 2008). En Tucumán, *D. maidis* tiene al menos cinco generaciones al año, que se desarrollan entre primavera y fines de verano. Los adultos provenientes de la última generación sobreviven el invierno y colonizan el cultivo de maíz durante la primavera siguiente (Virla *et al.*, 2003). Este comportamiento es similar al que tiene en México (Larsen *et al.*, 1992; 1993; Moya-Raygoza *et al.*, 2007). Por otro lado, la presencia de adultos de *D. maidis* en regiones donde no se cultivó maíz durante varios años, sugiere que estos insectos pueden migrar largas distancias (Oliveira *et al.*, 2002b).

En la región agrícola central del país, se ha detectado a *D. maidis* en el área de transición de clima templado al subtropical, entre los paralelos de latitud 30° S y 31° S, en las provincias de Córdoba y Santa Fe (Paradell *et al.*, 2001; 2005). Además, en lotes donde ha sido observado su vector principal, *S. kunkelii* fue identificado en plantas con síntomas característicos de la enfermedad.

En base a lo anteriormente planteado surge la necesidad de monitorear la presencia de *S. kunkelii* y su vector *D. maidis* en la región agrícola central de país, particularmente en zonas donde el cultivo de maíz está ampliamente distribuido.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.- Presencia, prevalencia e incidencia de la enfermedad en la región agrícola central de Argentina

En este trabajo se muestrearon 140 lotes en 99 localidades de las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe durante las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07. Estas provincias se encuentran en la región agrícola central de Argentina y concentran la mayor superficie sembrada con maíz (Guía práctica

para el cultivo de maíz, 1997; MAGyP, 2009). Como herramienta de descripción de la zona central del país, se utilizaron datos de localidades ubicadas en la zona núcleo maicera (Blanco, 2004), centro y noreste de la provincia de Córdoba y centro de Santa Fe (Fig. 2.1). Las localidades se encuentran en áreas agrícolas de clima templado y en la zona de transición del clima templado al subtropical, entre los paralelos de latitud 30° S y 31° S (Lorenzini *et al.*, 1995). Esta distinción fue realizada ya que *S. kunkelii* y *D. maidis* se encuentran regularmente al norte del paralelo de latitud 30° S y, en los últimos años, se alertó sobre su presencia en áreas agrícolas de clima templado del centro del país (Paradell *et al.*, 2005; Giménez Pecci *et al.*, 2005).

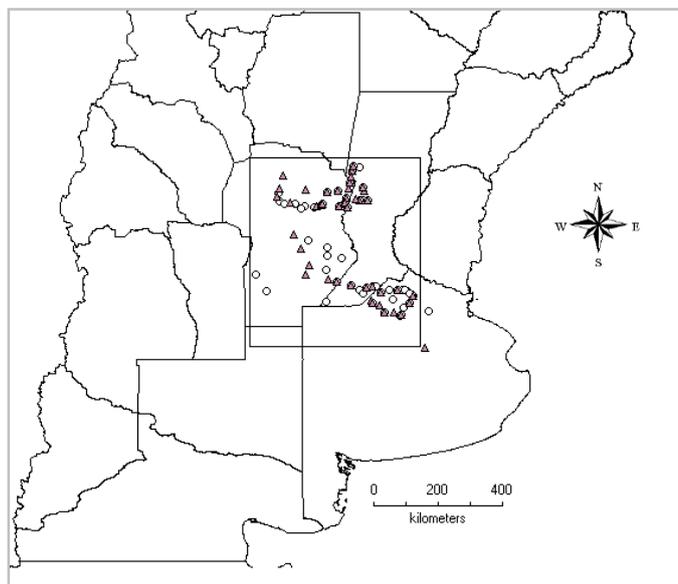


Fig. 2.1. Ubicación geográfica de las localidades donde se muestrearon lotes de maíz para detectar la presencia de *Spiroplasma kunkelii* (Witcomb) en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe en dos campañas agrícolas.

- (circulo): Campaña agrícola 2005-2006.
- △ (triangulo): Campaña agrícola 2006-2007.

Las localidades fueron georreferenciadas con un Sistema de Posicionamiento Global (GPS), y se consideraron localidades con presencia de enfermedad aquellas donde al menos se obtuvo una planta con reacción serológica positiva para *S. kunkelii* en los lotes evaluados para determinar incidencia (Fig. 2.1).

La detección de *S. kunkelii* en hojas de maíz se realizó mediante la técnica serológica de DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977), usando anticuerpos policlonales (anti *S. kunkelii*) comerciales junto con sus conjugados con fosfatasa alcalina (AGDIA Inc, USA). Se maceraron aproximadamente 0,2 g de tejido en un molidor de material vegetal (Bruchsal/Germany Typ-R32DT71K4/2) en tampón de extracción [(PBS (1 mM KH₂PO₄; 8 mM Na₂HPO₄; 0,13 M NaCl; 3 mM KCl) + 0,05% de Tween 20] en relación 1/5 (p/v). En cada placa de ELISA se colocaron 1 ó 2 controles positivos y 6 negativos. Los valores de absorbancia a 405 nm (A405) fueron determinados en un lector de ELISA (Dynex MRX II) después de la adición de p-nitrofenilfosfato como sustrato. Las muestras se consideraron positivas cuando los valores de absorbancia fueron superiores al valor promedio más tres desvíos estándares de los seis controles negativos (Carpane *et al.*, 2006).

La incidencia se evaluó colectando hojas de plantas ubicadas a lo largo de una diagonal. Cada 10 pasos se tomó la anteúltima hoja desplegada de cada planta. La muestra estuvo compuesta por 50 unidades muestrales por lote (Virla *et al.*, 2004). Se conservaron a 4 °C y fueron transportadas al laboratorio donde se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de la detección del patógeno. La incidencia se calculó como el número de muestras serológicamente positivas para *S. kunkelii* en relación al número total de muestras tomadas por lote. Finalmente se expresó por localidad, promediando los valores en los casos de localidades donde se muestrearon varios lotes.

Con los datos de incidencia obtenidos durante las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07, se generó un grafico para identificar las áreas de infección y los picos máximos de incidencia. El método de mapeo fue un método geoestadístico interpolativo (Sherpard) del programa Surfer Vers. 6.04 y consistió en un mapa tridimensional.

La prevalencia de la enfermedad se determinó en las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07 para las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. Se

consideró como prevalencia a la relación entre el número de lotes con presencia de la enfermedad y el número total de lotes muestreados por provincia (Nutter *et al.*, 1991).

2.2.- Presencia y abundancia de *Dalbulus maidis* en la región agrícola central de Argentina

En la zona agrícola central, se realizaron muestreos desde febrero del 2006 hasta abril del 2007. En cada lote, se muestreó el cultivo de maíz y la vegetación espontánea que circunda al cultivo (Fig. 2.2).

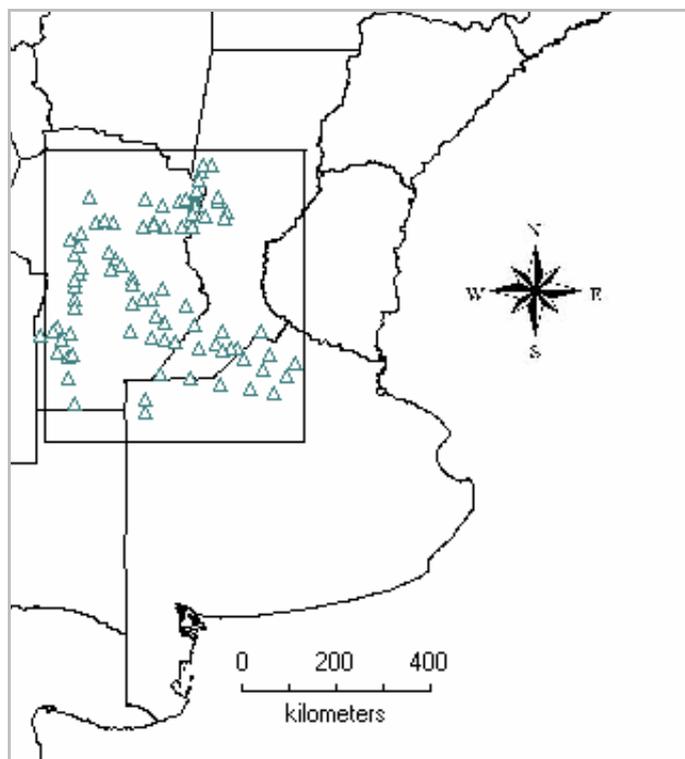


Fig. 2.2. Ubicación geográfica de las localidades donde se muestrearon lotes para detectar la presencia de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe en la región agrícola central del país.

Para la captura de insectos se empleó red entomológica de arrastre. Cada muestra estuvo constituida por toda la entomofauna capturada en 30 golpes de red (Virla *et al.*, 2004). El material recolectado se colocó en bolsas de nylon con un algodón humedecido en eter acético y se llevó al laboratorio para su separación y

recuento. Los individuos pertenecientes a cada fecha de muestreo se conservaron en alcohol 70% (v/v) hasta su identificación. La determinación de presencia y cantidad de individuos de *D. maidis* se llevó a cabo en la Cátedra de Entomología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata (UNLP), Argentina. Con estos resultados se generó un gráfico de distribución de *D. maidis* en la zona de estudio. El método de mapeo fue un método geoestadístico interpolativo (Sherpard) del programa Surfer V. 6.04 y consistió en un mapa tridimensional.

RESULTADOS

2.1.- Presencia, prevalencia e incidencia de la enfermedad en la región agrícola central de Argentina

Durante las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07 fueron analizados un total de 140 lotes de maíz en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe (Tablas 2.1 y 2.2), sumando un total de 7.000 plantas muestreadas. Se detectó la presencia de *S. kunkelii* en 40 localidades de las tres provincias monitoreadas durante las 2 campañas agrícolas (Tablas 2.1 y 2.2). Si bien en algunos lotes de las localidades monitoreadas en la zona central del país no se observaron plantas con síntomas típicos de la enfermedad, fue posible detectar la presencia de *S. kunkelii* mediante la técnica serológica de DAS-ELISA (resultados no mostrados).

En los lotes analizados de la campaña 2005/06 (Tabla 2.1), a partir del material colectado a campo, la presencia de *S. kunkelii* se detectó en Junín (Buenos Aires), Altos de Chipion, Arroyito, Colonia Caroya, Colonia Tirolesa, Los Chañaritos, Monte Cristo y Villa Concepción del Tío (Córdoba), y en Arrufó, Presidente Roca, Rafaela, San Antonio, San Guillermo, Tacural y Villa Trinidad (Santa Fe).

Tabla 2.1. Presencia e incidencia de achaparramiento del maíz causado por *Spiroplasma kunkelii* (Witcomb) detectado por DAS-ELISA en localidades de la región central de Argentina durante la campaña agrícola 2005/06.

Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Nº de lotes evaluados	Presencia de CSS	Incidencia (%)	Incidencia (%)
Buenos Aires	Arrecifes	34°03'59,76" S	60°06'59,76" W	1	-	0 (*)	0 (**)
	Coliqueo	34°39'59,76" S	60°30'59,76" W	1	-	0	0
	Colón	33°58'59,88" S	61°06'00,00" W	1	-	0	0
	Coronel Isleño	34°25'58,08" S	60°24'46,44" W	1	-	0	0
	Chacabuco	34°37'59,88" S	60°28'59,88" W	1	-	0	0
	El Arbolito	33°54'59,76" S	60°46'59,88" W	1	-	0	0
	Fontezuela	33°53'60,00" S	60°27'59,76" W	1	-	0	0
	General Arenales	34°18'21,24" S	61°18'54,00" W	1	-	0	0
	Junín	34°34'59,88" S	60°57'59,76" W	2	+	0-2	1
	Maguire	33°57'00,00" S	60°17'60,00" W	1	-	0	0
	Pergamino	33°53'60,00" S	60°34'59,88" W	2	-	0-0	0
	Rojas	34°12'00,00" S	60°34'59,88" W	1	-	0	0
	Salto	34°17'60,00" S	60°15'00,00" W	3	-	0-0-0	0
	Todd	34°01'59,88" S	60°09'59,76" W	1	-	0	0
	Tuyutí	34°31'59,88" S	59°40'59,88" W	1	-	0	0
Urquiza	33°54'59,76" S	60°22'59,88" W	1	-	0	0	
Viña	34°00'00,00" S	60°13'59,88" W	1	-	0	0	
Córdoba	Altos de Chipión	30°57'00,00" S	62°19'59,88" W	1	+	2	2
	Arias	33°38'60,00" S	62°23'60,00" W	2	-	0-0	0
	Arroyito	31°25'59,88" S	63°02'60,00" W	1	+	2	2
	Balnearia	31°00'00,00" S	62°40'59,88" W	1	-	0	0
	Bell Ville	32°37'59,88" S	62°39'59,76" W	1	-	0	0
	Colonia Bismarck	33°17'60,00" S	62°42'59,76" W	1	-	0	0
	Colonia Caroya	31°01'59,88" S	64°05'60,00" W	1	+	2	2
	Colonia Tirolesa	31°15'59,76" S	64°04'59,88" W	3	+	0-0-2	1
	Devoto	31°15'59,76" S	62°18'59,76" W	2	-	0-0	0
	El Tío	31°15'59,76" S	62°49'59,88" W	1	-	0	0
	Freyre	31°15'59,76" S	62°49'59,88" W	1	-	0	0
	Inriville	32°57'00,00" S	62°13'59,88" W	1	-	0	0
	Justiniano Posse	32°52'59,88" S	62°39'59,76" W	1	-	0	0
	Los Chañaritos	31°24'59,76" S	63°21'00,00" W	1	+	2	2
	Luxardo	31°18'00,00" S	62°07'59,88" W	1	-	0	0
	Monte Cristo	31°21'00,00" S	63°57'00,00" W	3	+	0-0-2	1
	Morteros	30°42'59,76" S	62°00'00,00" W	1	-	0	0
	Río Primero	31°19'59,88" S	63°37'59,88" W	1	-	0	0
	San Francisco	31°25'44,40" S	62°05'04,88" W	1	-	0	0
	Santiago Temple	31°29'26,52" S	63°25'48,36" W	2	-	0-0	0
Suco	33°27'00,00" S	64°46'59,88" W	1	-	0	0	
Va. Concp. del Tío	31°19'59,88" S	62°48'59,76" W	2	+	0-2	1	
Vicuña Mackenna	33°57'16,20" S	64°28'04,44" W	1	-	0	0	
Villa Maria	32°24'49,68" S	63°13'58,44" W	2	-	0-0	0	
Santa Fe	Arrufó	30°13'59,88" S	61°43'59,88" W	2	+	0-15	7,5
	Hughes	33°47'60,00" S	61°19'59,88" W	1	-	0	0
	Pres. Roca	31°13'00,00" S	61°37'00,00" W	1	+	6	6
	Rafaela	31°15'00,00" S	61°28'59,88" W	2	+	0-2	1
	Rufino	34°15'59,76" S	62°42'00,00" W	1	-	0	0
	San Antonio	31°13'01,56" S	61°44'00,24" W	1	+	2	2
	San Guillermo	30°21'59,76" S	61°54'59,76" W	2	+	0-2	1
	Santa Emilia	33°49'59,88" S	61°30'59,76" W	1	-	0	0
	Santa Isabel	33°53'60,00" S	61°42'00,00" W	1	-	0	0
	Tacural	30°51'00,00" S	61°36'00,00" W	1	+	2	2
	Venado Tuerto	33°45'59,76" S	61°57'59,76" W	3	-	0-0-0	0
	Villa Cañas	34°00'59,76" S	61°36'00,00" W	1	-	0	0
	Villa Trinidad	30°12'59,97" S	61°52'59,88" W	1	+	5	5
	Wheelright	33°47'60,00" S	61°12'59,76" W	1	-	0	0

(-): Ausencia, (+): presencia (al menos una planta enferma por localidad), (*) incidencia por lote y (**): valores promedios por localidad

Tabla 2.2. Presencia e incidencia de achaparramiento del maíz causado por *Spiroplasma kunkelii* (Witcomb) detectado por DAS-ELISA en localidades de la región central de Argentina durante la campaña agrícola 2006/07.

Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Nº de lotes evaluados	Presencia de CSS	Incidencia (%)	Incidencia (%)
Buenos Aires	Arrecifes	34°03'59,76" S	60°06'59,76" W	3	+	0-0-2 (*)	1 (**)
	Arribeños	34°12'59,76" S	61°21'00,00" W	1	-	0	0
	Colón	33°58'59,88" S	61°06'00,00" W	3	+	0-0-2	1
	Chacabuco	34°37'59,88" S	60°28'59,88" W	2	-	0-0	0
	Fortín Tiburcio	34°21'00,00" S	61°07'59,88" W	1	-	0	0
	General Arenales	34°18'21,24" S	61°18'54,00" W	1	-	0	0
	Junín	34°34'59,88" S	60°57'59,76" W	3	-	0-0-0	0
	O'Higgins	34°34'59,88" S	60°42'00,00" W	2	-	0	0
	Pergamino	33°53'60,00" S	60°34'59,88" W	1	-	0	0
	Saladillo	35°37'59,88" S	59°46'59,88" W	1	+	5	5
Salto	34°17'60,00" S	60°15'00,00" W	3	-	0-0-0	0	
Córdoba	Alejo Ledesma	33°36'00,00" S	62°36'59,76" W	3	-	0-0-0	0
	Altos de Chipión	30°57'00,00" S	62°19'59,88" W	1	+	2	2
	Arias	33°38'60,00" S	62°23'60,00" W	2	-	0	0
	Balnearia	31°00'00,00" S	62°40'59,88" W	2	+	12-2	7
	Barranca Yaco	30°51'59,76" S	64°04'59,88" W	6	+	0-0-14-5-4-16	6
	Brinkmann	30°51'59,76" S	62°01'59,88" W	1	+	21	21
	Devoto	31°15'59,76" S	62°18'59,76" W	1	+	6	6
	El Fuertecito	31°24'59,76" S	62°58'59,88" W	1	+	2	2
	El Tío	31°15'59,76" S	62°49'59,88" W	1	-	0	0
	Freyre	31°15'59,76" S	62°49'59,88" W	2	+	23-8	15
	General Paz	31°08'09,24" S	64°07'59,16" W	1	+	20	20
	La Carlota	33°25'59,88" S	63°17'60,00" W	1	-	0	0
	La Paqueta	30°53'60,00" S	63°17'60,00" W	1	+	18	18
	Luxardo	31°18'00,00" S	62°07'59,88" W	1	+	12	12
	Morteros	30°42'59,76" S	62°00'00,00" W	2	+	9-8	8
	Pampayasta	32°15'46,80" S	63°39'17,64" W	1	-	0	0
	Piquillín	31°18'00,00" S	63°45'59,76" W	1	+	2	2
	San Francisco	31°25'44,40" S	62°05'04,88" W	1	+	2	2
Santa Eufemia	33°09'56,16" S	63°11'44,88" W	1	-	0	0	
Simbolar	30°28'59,88" S	63°58'59,88" W	1	-	0	0	
Ticino	32°40'59,88" S	63°25'59,88" W	1	-	0	0	
Va. Concp. del Tío	31°19'59,88" S	62°48'59,76" W	2	+	15-2	8	
Santa Fe	Hughes	33°47'60,00" S	61°19'59,88" W	1	-	0	0
	San Antonio	31°13'01,56" S	61°44'00,24" W	1	+	4	4
	San Guillermo	30°21'59,76" S	61°54'59,76" W	1	+	14	14
	Santa Emilia	33°49'59,88" S	61°30'59,76" W	1	-	0	0
	Suardi	30°31'59,88" S	61°57'59,76" W	2	+	29-8	18
	Sunchales	30°57'00,00" S	61°34'59,88" W	1	+	2	2
	Venado Tuerto	33°45'59,76" S	61°57'59,76" W	1	+	0	0
	Rafaela	31°15'00,00" S	61°28'59,88" W	1	+	9	9
	Tacural	30°51'00,00" S	61°36'00,00" W	1	+	5	5
	Vila	31°12'00,00" S	61°49'59,88" W	1	+	21	21
Villa Trinidad	30°12'59,97" S	61°52'59,88" W	1	+	6	6	

(-): Ausencia, (+): presencia (al menos una planta enferma por localidad), (*) incidencia por lote y (**): valores promedios por localidad

En la campaña agrícola 2006/07 (Tabla 2.2) se observó un aumento en el número de localidades donde fue registrada la enfermedad. Se confirmó la presencia de *S. kunkelii* en las localidades de Arrecifes, Colón, Saladillo (Buenos Aires) Altos de Chipión, Balnearia, Barranca Yaco, Brinkmann, Devoto, El Fuertecito, Freyre, General Paz, La Paqueta, Luxardo, Morteros, Piquillín, San

Francisco y Villa Concepción del Tío (Córdoba), y San Antonio, San Guillermo, Suardi, Sunchales, Rafaela, Tacural, Vila y Villa Trinidad (Santa Fe).

Los resultados de incidencia promedio obtenidos por localidad en lotes monitoreados en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe se observan en las Tablas 2.1 y 2.2. Los valores promedios de incidencia de las tres provincias fueron en general más elevados durante la campaña agrícola 2006/07 que en la campaña 2005/06 (Fig. 2.3). Además, en las dos campañas agrícolas analizadas, los niveles de incidencia promedios más altos se detectaron en la provincia de Santa Fe y los más bajos en Buenos Aires. Los valores de incidencia máxima en lotes de la provincia de Buenos Aires fueron 2% en la campaña agrícola 2005/06 y 5% durante la campaña 2006/07. En la provincia de Córdoba, estos valores fueron del 3% y 23%, respectivamente. En Santa Fe se determinaron valores de 15% y 29% en las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07 respectivamente (Fig. 2.4).

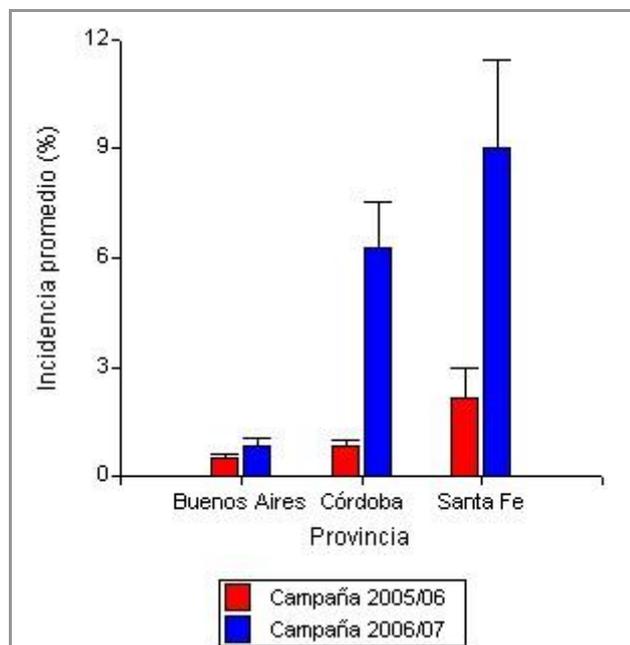


Fig. 2.3. Incidencia promedio de *Spiroplasma kunkelii* (Witcomb) en provincias de la región central de Argentina durante las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07.

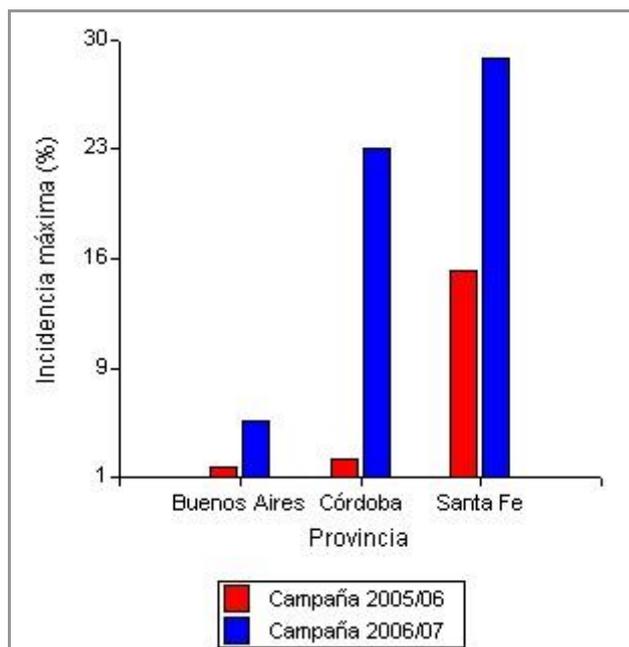


Fig. 2.4. Valores máximos de incidencia de *Spiroplasma kunkelii* (Witcomb) en lotes de maíz de diferentes provincias de la región central de Argentina durante las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07.

El mapa geoestadístico mostró que los picos máximos de incidencia se encuentran ubicadas al norte de la zona de estudio, en la franja que comprende los 30° a los 31° de latitud sur, esto es en la zona de transición del clima templado al subtropical. En la distribución espacial se observa además una disminución en los niveles de incidencia en latitudes mayores (Fig. 2.5).

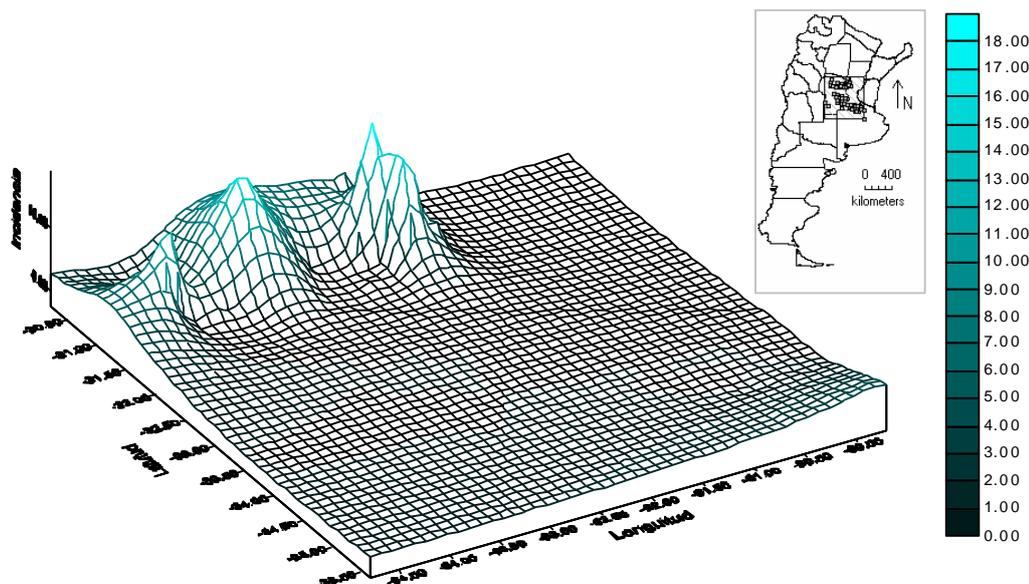


Fig. 2.5. Distribución espacial de los valores de incidencia de *Spiroplasma kunkelii* (Witcomb) en lotes de maíz durante las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07 en las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires.

Durante la campaña agrícola 2006/07, aumentó el número de lotes afectados por achaparramiento en relación a la campaña anterior. La prevalencia de la enfermedad en la campaña 2005/06 fue más alta en la provincia de Santa Fe (37%), seguida por Córdoba (18%) y Buenos Aires (5%). Estos valores están basados sobre un total de 19, 33 y 20 lotes muestreados en la campaña agrícola 2005/06, en las tres provincias respectivamente (Tabla 2.3). Igual que en la campaña agrícola anterior, en la provincia de Santa Fe se observaron los valores más altos de prevalencia de la enfermedad, alcanzando índices del 77%, seguida por Córdoba (62%) y Buenos Aires (14%). En estas provincias, durante la campaña agrícola 2006/07 se evaluaron 12, 34 y 21 lotes de maíz, respectivamente (Tabla 2.3 y Fig. 2.6).

Tabla 2.3. Prevalencia de *Spiroplasma kunkelii* (Witcomb) en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe en dos campañas agrícolas.

Campaña agrícola	Buenos Aires		Córdoba		Santa Fe	
	N(*)	lotes positivos (%)	N	lotes positivos (%)	N	lotes positivos (%)
2005/06	20	5	33	18	19	37
2006/07	21	14	34	62	12	75

(*): número de lotes monitoreados por provincia

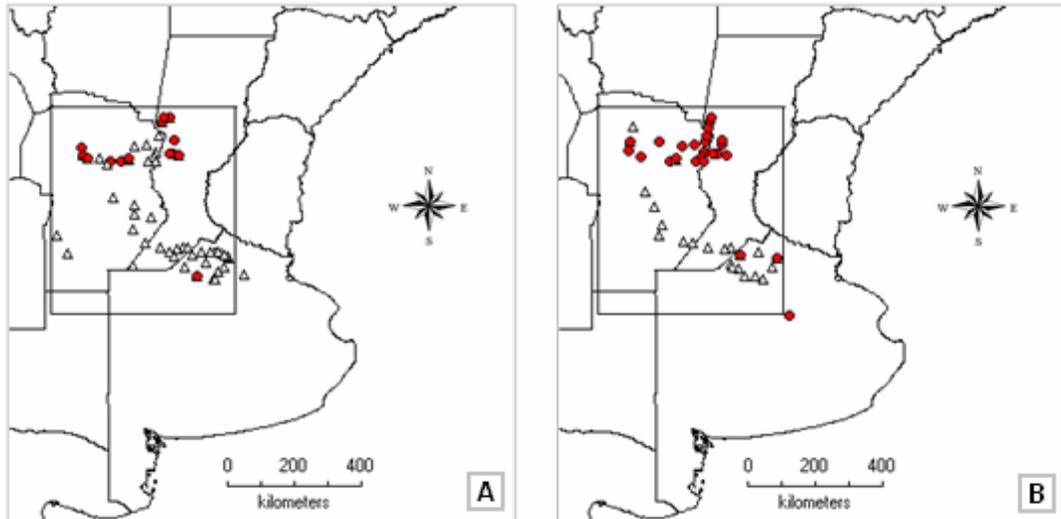


Fig. 2.6. Distribución de lotes afectados con *Spiroplasma kunkelii* (Witcomb) en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. A: campaña agrícola 2005/06. B: campaña agrícola 2006/07.

- (círculo): Lotes positivos
- △ (triángulo): Lotes negativos

2.2.- Presencia y abundancia de *Dalbulus maidis* en la región agrícola central de Argentina

Para la identificación de *D. maidis* en la zona productora de maíz en estudio, se monitorearon 142 lotes en 87 localidades entre febrero de 2006 y abril de 2007, pertenecientes a las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. El vector se encontró en 49 % de las localidades del área maicera donde se realizaron muestreos (Fig. 2.7).

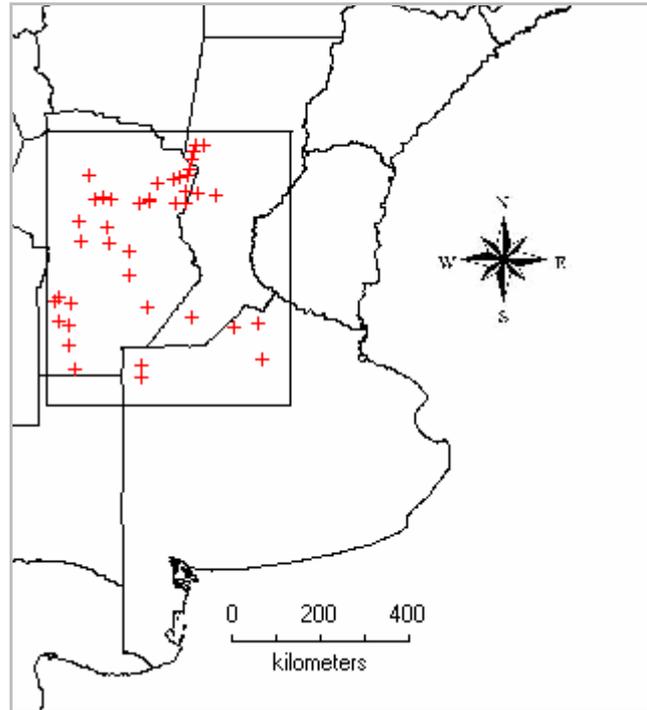


Fig. 2.7. Localidades donde se detectó la presencia de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe de la región agrícola central de Argentina entre febrero de 2006 y abril de 2007.

En los lotes analizados desde febrero del 2006 hasta abril del 2007 (Tablas 2.4 y 2.5) *D. maidis* estuvo presente en las localidades de Coliqueo, Colón, General Villegas, Pergamino y Piedritas (Buenos Aires), Almafuerde, Altos de Chipión, Arroyito, Balnearia, Barranca Yaco, Brinkmann, Canals, Del Campillo, Del Prato, Despeñaderos, Devoto, El Tío, Etruria, Freyre, General Paz, Huinca Renancó, La Paquita, Malena, Monte Cristo, Morteros, Oncativo, Pampayasta, Piquillín, Río Primero, Sampacho, San Francisco, Suco, Villa Concepción del Tío, Vicuña Mackenna, Villa María y Washington (Córdoba), Arrufó, Rafaela, San Antonio, San Guillermo, Suardi, Venado Tuerto, Vila, Villa Trinidad (Santa Fe).

Tabla 2.4. Presencia de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) en localidades de la región central de Argentina en los monitoreos realizados entre los meses de febrero de 2006 y abril de 2007.

Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Nº de lotes	Presencia de <i>D. maidis</i>
Buenos Aires	Arrecifes	34°03'59,76" S	60°06'59,76" W	1	-
	Coliqueo	34°39'59,76" S	60°30'59,76" W	1	+
	Colón	33°58'59,88" S	61°06'00,00" W	4	+
	General Villegas	35°02'12,51" S	63°01'05,26" W	2	+
	Junín	34°34'59,88" S	60°57'59,76" W	3	-
	Pergamino	33°53'60,00" S	60°34'59,88" W	2	+
	Piedritas	34°46'59,88" S	63°00'00,00" W	1	+
	Rojas	34°12'00,00" S	60°34'59,88" W	2	-
	Salto	34°17'60,00" S	60°15'00,00" W	1	-
Vedia	34°30'00,00" S	61°31'59,88" W	1	-	
Córdoba	Alejo Ledesma	33°36'00,00" S	62°36'59,76" W	2	-
	Almafuerte	32°12'00,00" S	64°15'00,00" W	2	+
	Alta Gracia	31°39'59,76" S	64°25'59,88" W	1	-
	Altos de Chipión	30°57'00,00" S	62°19'59,88" W	1	+
	Arias	33°38'60,00" S	62°23'60,00" W	2	-
	Arroyito	31°25'59,88" S	63°02'60,00" W	3	+
	Balnearia	31°00'00,00" S	62°40'59,88" W	1	+
	Barranca Yaco	30°51'59,76" S	64°04'59,88" W	2	+
	Bell Ville	32°37'59,88" S	62°39'59,76" W	2	-
	Berrotaran	32°27'59,76" S	64°22'59,88" W	2	-
	Bower	31°32'46,68" S	64°14'42,72" W	1	-
	Brinkmann	30°51'59,76" S	62°01'59,88" W	1	+
	Canals	33°33'59,76" S	62°52'59,88" W	3	+
	Chaján	33°32'60,00" S	65°00'59,76" W	1	-
	Coronel Baigorria	32°51'04,32" S	64°21'15,84" W	1	-
	Coronel Moldes	33°37'59,16" S	64°35'56,76" W	1	-
	Cotagaita	30°54'59,76" S	62°02'60,00" W	1	+
	Del Campillo	34°21'59,76" S	64°30'00,00" W	1	-
	Del Prato	30°51'59,76" S	64°04'59,88" W	1	+
	Despeñaderos	31°48'59,76" S	64°17'60,00" W	2	+
	Devoto	31°15'59,76" S	62°18'59,76" W	3	+
	El Tío	31°15'59,76" S	62°49'59,88" W	2	+
	Elena	32°33'59,76" S	64°21'59,76" W	1	-
	Espinillo	33°00'59,76" S	64°20'60,00" W	2	-
	Etruria	32°55'59,88" S	63°13'59,88" W	1	+
	Freyre	31°15'59,76" S	62°49'59,88" W	3	+
	General Ordoñez	32°51'06,12" S	62°52'23,88" W	1	-
	General Paz	31°08'09,24" S	64°07'59,16" W	1	+
	Huinca Renancó	34°51'00,00" S	64°21'59,76" W	2	+
	Idiazábal	32°48'59,76" S	63°01'59,88" W	1	-
	Inriville	32°57'00,00" S	62°13'59,88" W	1	-
	James Craik	32°09'59,76" S	63°27'59,76" W	1	-
La Carlota	33°25'59,88" S	63°17'60,00" W	1	-	
La Francia	31°24'59,76" S	62°37'59,88" W	2	-	
La Paqueta	30°54'12,96" S	62°12'28,08" W	1	+	
La Para	30°52'59,88" S	63°00'00,00" W	1	-	

- : ausencia, +: presencia (al menos un *D. maidis* por localidad)

Tabla 2.5. Presencia de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) en localidades de la región central de Argentina en los monitoreos realizados entre los meses de febrero de 2006 y abril de 2007.

Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Nº de lotes	Presencia de <i>D. maidis</i>
Córdoba	Los Cóndores	32°18'59,97" S	64°15'59,76" W	1	-
	Luxardo	31°18'00,00" S	62°07'59,88" W	1	-
	Malena	33°30'00,00" S	64°25'59,88" W	2	+
	Monte Cristo	31°21'00,00" S	63°57'00,00" W	1	+
	Monte Maíz	33°17'52,44" S	62°37'51,96" W	1	-
	Morteros	30°42'59,76" S	62°00'00,00" W	1	+
	Oliva	32°02'60,00" S	63°34'59,88" W	1	-
	Oncativo	31°54'59,76" S	63°34'59,88" W	1	+
	Pampayasta	32°15'46,08" S	63°39'17,64" W	1	+
	Piquillín	31°18'00,00" S	63°45'59,76" W	1	+
	Porteña	31°01'59,88" S	62°03'59,76" W	1	-
	Río Primero	31°19'59,88" S	63°37'59,88" W	3	+
	Sampacho	33°22'59,88" S	64°42'00,00" W	4	+
	San Agustín	32°58'59,88" S	64°21'59,76" W	1	-
	San Francisco	31°25'44,04" S	62°05'04,88" W	5	+
	Suco	33°27'00,00" S	64°46'59,88" W	2	+
	Va. Concp. del Tío	31°19'59,88" S	62°48'59,76" W	3	+
	Vicuña Mackenna	33°57'16,02" S	64°28'04,44" W	6	+
	Villa Maria	32°24'49,68" S	63°13'58,44" W	4	+
Wenceslao Escalante	33°10'59,88" S	62°46'59,88" W	1	-	
Washington	33°52'59,88" S	64°42'00,00" W	3	+	
Santa Fe	Arrufó	30°13'59,88" S	61°43'59,88" W	1	+
	Chanar Ladeado	33°18'59,76" S	62°01'59,88" W	1	-
	Diego de Alvear	34°22'26,04" S	62°07'37,56" W	1	-
	Elortondo	33°42'00,00" S	61°37'59,88" W	1	-
	Firmat	33°27'00,00" S	61°30'00,00" W	1	-
	Hughes	33°47'60,00" S	61°19'59,88" W	1	-
	Lemhann	31°06'59,76" S	61°25'59,88" W	1	-
	Rafaela	31°15'00,00" S	61°28'59,88" W	3	+
	Rufino	34°15'59,76" S	62°42'00,00" W	1	-
	San Antonio	31°12'37,44" S	61°43'26,76" W	1	+
	San Guillermo	30°21'59,76" S	61°54'59,76" W	1	+
	Santa Emilia	33°49'59,88" S	61°30'59,76" W	1	-
	Santa Teresa	33°25'59,88" S	60°46'59,88" W	1	-
	Suardi	30°31'59,88" S	61°57'59,76" W	1	+
	Sunchales	30°57'00,00" S	61°34'59,88" W	1	-
	Tacural	30°51'00,00" S	61°36'00,00" W	1	-
	Venado Tuerto	33°45'59,76" S	61°57'59,76" W	4	+
	Vila	31°12'00,00" S	61°49'59,88" W	1	+
	Villa Trinidad	30°12'59,97" S	61°52'59,88" W	1	+
Wheelwright	33°47'60,00" S	61°12'59,76" W	1	-	

- : ausencia, +: presencia (al menos un *D. maidis* por localidad)

En el mapa geoestadístico obtenido con los datos de incidencia, se puede observar que el mayor número de insectos (abundancia) se encuentra ubicado al norte de la región agrícola central, disminuyendo hacia latitudes mayores (Fig. 2.8).

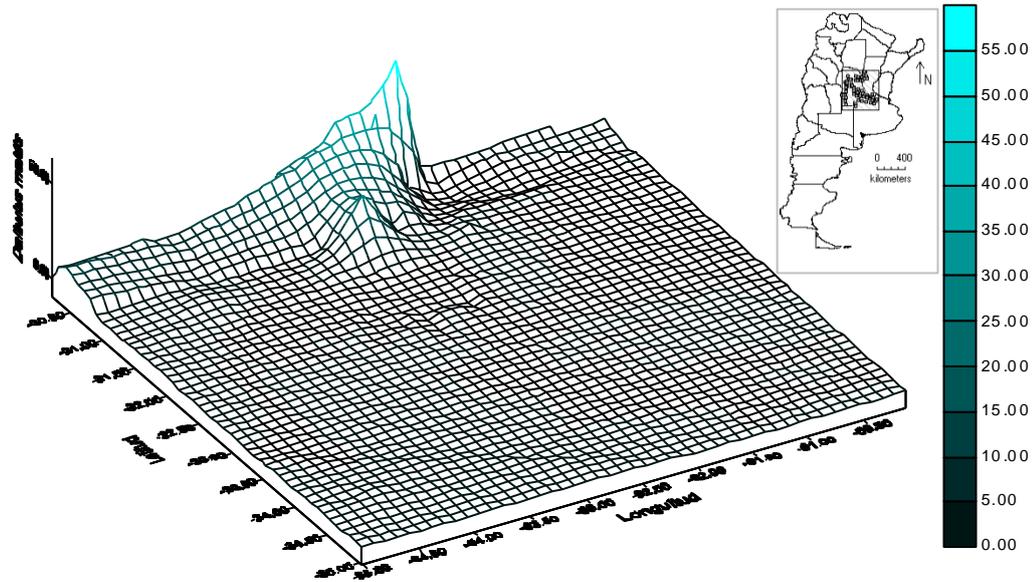


Fig. 2.8. Distribución espacial del número de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) recolectados por lote en las localidades monitoreadas de las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires entre febrero de 2006 y abril de 2007.

DISCUSIÓN

En este capítulo se confirma la presencia del achaparramiento del maíz causado por *S. kunkelii* en la región agrícola central del país. La enfermedad se encuentra en Córdoba, Santa Fe y en algunas regiones del norte y centro de Buenos Aires, en la denominada zona núcleo maicera. Por lo tanto se enfatiza que el achaparramiento no es solamente un problema fitosanitario en el norte Argentino (Giménez Pecci *et al.*, 1997; 2002a; 2002b; 2003), sino que también se encuentra en las tres provincias que concentran la mayor superficie cultivada con maíz. Estos resultados concuerdan con los mencionados por Giménez Pecci *et al.* (2005), quienes observaron por primera vez la presencia del achaparramiento durante la campaña agrícola 2003/04 en la región agrícola central del país.

La incidencia de la enfermedad varía sustancialmente según la provincia y la campaña agrícola. El achaparramiento tuvo valores de incidencia más altos en Santa Fe, le sigue Córdoba y finalmente Buenos Aires. Las localidades con incidencia promedios más altos se encuentran en la zona de transición del clima

templado al subtropical (entre los paralelos de latitud 30° S y 31° S). En estos lotes se observó el valor máximo de incidencia detectado, 29% en la localidad de Suardi (Santa Fe), campaña agrícola 2006/07.

En el presente estudio, al analizar el número de *D. maidis* por lote en las tres provincias evaluadas de la zona agrícola central, vemos que en los meses de febrero a abril la abundancia de insectos disminuye hacia el sur. La mayor cantidad de insectos se observa en las áreas más cálidas de la zona muestreada. En Brasil, Oliveira y colaboradores (2002a) relacionaron altas incidencias con elevada cantidad de *D. maidis* al inicio del cultivo, cuando las plantas son más susceptibles a la infección por el patógeno (Hruska y Gomez Peralta, 1997; Massola Júnior *et al.*, 1999). De esta manera, la mayor cantidad de insectos encontrada en la zona de transición al clima subtropical explica la mayor incidencia de achaparramiento observada en estos lotes.

Durante las dos campañas agrícolas, la mayor cantidad de lotes con presencia de achaparramiento de maíz fueron en la zona de transición de clima templado al subtropical. Es probable que en la zona donde se observa la mayor cantidad de lotes afectados por *S. kunkelii*, la presencia de *D. maidis* se vea favorecida por las condiciones climáticas reinantes permitiéndole la subsistencia durante todo el año. Esto podría permitir que las poblaciones de *D. maidis* invernantes colonicen rápidamente el cultivo de maíz sembrado en primavera y afecten de manera favorable la dispersión de *S. kunkelii* en las localidades próximas ubicadas en la zona de transición. La permanencia del insecto vector durante todo el año fue observado en Tucumán (Virla *et al.*, 2003), donde Giménez Pecci *et al.* (2002b) y Virla *et al.* (2004) mencionan que el achaparramiento del maíz se encuentra ampliamente difundido en diferentes regiones agroecológicas.

La menor prevalencia e incidencia del achaparramiento en Buenos Aires y lotes del sur del área de estudio (zona templada), pueden atribuirse a las menores poblaciones de *D. maidis*, ocasionada por las bajas temperaturas de la región.

Durante el invierno, se registran temperaturas inferiores a 0 °C (SMN, 2005; 2006). Se conoce que en condiciones de laboratorio, *D. maidis* no sobrevive con temperaturas inferiores a los 2 °C (Larsen *et al.*, 1992; 1993).

Por otro lado, la ocurrencia del achaparramiento en altas latitudes puede explicarse por la presencia de *D. maidis* durante los meses en que se encuentra implantado el cultivo cuando la temperatura promedio es de 23 °C. En este sentido, estudios previos demostraron que el vector en esta zona esta solamente en el periodo estival (Paradell *et al.*, 2005), por lo que es posible que la presencia de *S. kunkelii* se deba a individuos migrantes de *D. maidis* infectivos que llegan desde zonas endémicas. De hecho, la actividad migratoria de *D. maidis* fue planteada por otros autores, y ha sido mencionada como una especie dotada de gran capacidad de dispersión (Oliveira *et al.*, 2002b; Moya-Raygoza *et al.*, 2007).

Para las tres provincias, se detectó mayor prevalencia e incidencia en la campaña agrícola 2006/2007. Esto puede relacionarse con el hecho que, previo a dicha campaña, para varias localidades del centro y norte del país, el invierno fue el más cálido de los últimos 50 años (SMN, 2006). Esto podría haber causado una mayor supervivencia de las poblaciones de *D. maidis* en lugares donde se encuentran durante la estación invernal y haber ocasionado el aumento en la prevalencia e incidencia observada en este estudio, tal como se encontró en el caso de *Delphacodes kuscheli* Fennah, el principal vector de *Mal de Río Cuarto* virus (MRCV)(Remes Lenicov *et al.*, 1985; March *et al.*, 1995; Lenardon *et al.*, 1998).

Con respecto a la distribución del vector, los resultados de este trabajo indican que *D. maidis* se encuentra durante el verano en el cultivo de maíz en la región central del país. En el caso de la provincia de Santa Fe, trabajos previos indican que al insecto se lo encuentra regularmente en el norte de la provincia (clima subtropical) y en los meses de verano en la zona de transición al subtrópico (centro de la provincia de Santa Fe) (Paradell *et al.*, 2001; Giménez Pecci *et al.*, 2003). En este estudio se confirmó la presencia del vector en la zona de transición,

en las localidades de Arrufó, Rafaela, San Antonio, San Guillermo, Suardi, Vila y Villa Trinidad. Adicionalmente, se encontró *D. maidis* en la región sur de la provincia de Córdoba, centro-sur de Santa Fe y norte de Buenos Aires, en localidades de la zona maicera núcleo.

Es importante mencionar que en Junín (campaña agrícola 2005/06) y Arrecifes (campaña agrícola 2006/07), localidades de la provincia de Buenos Aires, se encontró el patógeno *S. kunkelii*, pero no el vector *D. maidis*. Esto sugiere la presencia de otra especie como vector de *S. kunkelii*.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo confirma la presencia del achaparramiento del maíz causado por *Spiroplasma kunkelii* y de su vector *Dalbulus maidis* en la región agrícola central de Argentina, hasta los paralelos de latitud 35°37'59,88" S y 35°02'12,51" S, respectivamente.

Se observa una mayor cantidad de individuos de *D. maidis* al norte del área estudiada: el área de transición del clima templado al subtropical, junto a mayores niveles de incidencia del achaparramiento del maíz.

BIBLIOGRAFÍA

- Albarracin E. L., Paradell S. and Virla E. G. 2008. Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha) associated with maize crops in northwestern Argentina, influence of the sowing date and phenology of their abundance and diversity. *Maydica* 53(3-4): 289-296.
- Blanco H. R. 2004. El papel del maíz en la zona núcleo maicera argentina. *Mundo Maíz Integrando la Cadena de Valor*. Buenos Aires, Argentina. 75-81.
- Bradfute O. E., Tsai J. H. and Gordon D. T. 1981. Corn stunt Spiroplasma and viruses associated with a maize disease epidemic in Southern Florida. *Plant Disease*. 65: 837-841.
- Carpane P., Laguna I. G., Virla E., Paradell S., Murúa L. and Giménez Pecci M. P. 2006. Experimental transmission of corn stunt Spiroplasma present in different regions of Argentina. *Maydica*. 51: 461-468.
- Clark M. and Adams A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-482.
- Ebbert M. A., Jeffers D. P., Harrison N. A. and Nault L. R. 2001. Lack of specificity in the interaction between two maize stunting pathogens and field collected *Dalbulus* leafhoppers. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 101: 49-57.
- Hruska A. J., Gladstone S. M. and Obando R. 1996. Epidemic Roller Coaster: Maize Stunt Disease in Nicaragua. *American Entomologist*. 42 (4): 248-252.
- Hruska A. J. and Gomez Peralta M. 1997. Maize Response to Corn Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) Infestation and Achaparramiento Disease. *Journal of Economic Entomology*. 90 (2): 604-610.
- Giménez Pecci M. P., Laguna I. G., Ploper L. D., Remes Lenicov A. M. M., Paradell S. y Virla E. 1997. Avance del "corn stunt" del maíz en el Norte Argentino. *Avance Agroindustrial*. 71: 31-33.
- Giménez Pecci M. P., Laguna I. G., Avila A. O., Remes Lenicov A.M., Virla E., Borgogno C., Nome C. y Paradell S. 2002a. Difusión del Corn Stunt Spiroplasma del Maíz (*Spiroplasma kunkelii*) y del vector (*Dalbulus maidis*) en la Republica Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 105(1):1-8.
- Giménez Pecci M. P., Oliveira E., Resende R. O., Laguna I. G., Conci L. R., Avila A., Herrera P., Galdeano E., Virla E. y Nome C. 2002b. Ocorrência de doenças causadas por mollicutes e por vírus em milho nas províncias de Tucumán e de Córdoba na Argentina. *Fitopatologia Brasileira*. 27:403-407.
- Giménez Pecci M. P., Carpane P. D., Nome C. F., Paradell S., Remes Lenicov A. M., Virla E., y Laguna I. G. 2003. Presencia del Corn stunt Spiroplasma y su vector *Dalbulus maidis* en el noroeste Argentino. XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatología. Brazilian Phytopathology Society. 28: S253.
- Giménez Pecci M. P., Laguna I. G., Carpane P., Carloni E. y Murua L. 2005. Dispersión e incidencia del Corn Stunt Spiroplasma en el cultivo de maíz en diferentes áreas de Argentina. XIII Congreso Latinoamericano de

- Fitopatología y III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. 19-22 de abril de 2005. p: 477.
- Guía práctica para el cultivo de maíz. 1997. Publicado en internet, disponible en: <http://www.inta.gov.ar/info/trigo.pdf>. Activo Octubre 2009.
- Larsen K. J., Nault L. R. and Moya-Ragoza G. 1992. Overwintering biology of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae): adult populations and drought hardiness. *Environmental entomology*. 21: 566-577.
- Larsen K. J., Lee R. E. and Nault L. R. 1993. Influence of developmental conditions on cold-hardiness of adult *Dalbulus* leafhoppers: implications for overwintering. *Entomologia experimentalis et applicata*. 67: 99-108.
- Lenardon S. L., Laguna I. G., Gordon D. L., Truol G. A., Gomez G. and Bratfute O. E. 1992. Identification of corn stunt spiroplasma in maize from Argentina. *Plant Disease*. 77(1):100.
- Lenardon S. L., March G. J., Nome S. F. and Ornaghi J. A. 1998. Recent outbreak of “Mal de Río Cuarto” virus on corn in Argentina. *Plant Disease*. 82: 448.
- Lorenzini H., R. Balmaceda, y Echeverría M. 1995. Geografía de la Argentina. Ed. A-Z Editora. Buenos Aires Argentina.
- Madden L. V. and Nault L. R. 1983. Differential Pathogenicity of Corn Stunt Mollicutes to Leafhopper Vectors in *Dalbulus* and *Baldbulus* species. *Phytopathology*. 73:1608-1614.
- MAGyP - Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. 2009. Cultivos. Publicado en Internet, disponible en <http://190.220.136.179/index.php/por-cultivo>. Activo noviembre 2009.
- March G. J., Balzarini M., Ornaghi J. A. Beviacqua J. E. and Marinelli A. 1995. Predictive Model for “Mal de Rio Cuarto” Disease Intensity. *Plant Disease*. 79: 1051-1053.
- Massola Júnior N. S., Bedendo I. P., Amorim L. e Lopes J. R. S. 1999. Effects of the inoculation time on corn with *Spiroplasma kunkelii* on yield components. *Fitopatologia Brasileira*. 24(4):571-573.
- Moya-Raygoza G., Palomera-Avalos V. and Galaviz-Mejia C. 2007. Field overwintering biology of *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) and its vector *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Annals of Applied Biology*. 151(3). 373-379.
- Nault L. R. 1980. Maize Bushy Stunt and Corn Stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. *Phytopathology*. 70: 659-662.
- Nault L. R., Gingery R. E. and Gordon D.T. 1980. Leafhopper transmission and host range of maize rayado fino virus. *Phytopathology* 70:709-12.
- Nutter F. W., Teng P. S. and Shokes F. M. 1991. Disease assessment terms and concepts. *Plant Disease* 75: 1187-1188.
- Oliveira E., Waquil J. M., Fernandes F. T., Paiva E., Resende R. O. e Kitajima E. W. 1998. “Enfezamento pálido” e “enfezamento vermelho” na cultura do milho no Brasil Central. *Fitopatología Brasileira*. 23:45-47.
- Oliveira E., Carvalho R. V., Duarte A. P., Andrade R. A., Resende R. O., Oliveira C. M. e Recco P. C. 2002a. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 1(2): 38-46.

- Oliveira C. M., Molina R. M. S., Albres R. S. e Lopes J. R. S. 2002b. Disseminação de mollicutes do milho a longas distancias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). Fitopatologia Brasileira. 27: 91-95.
- Paradell S. 1995. Especies argentinas de Homópteros Cicadélidos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.). Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata. 71:213-234.
- Paradell S. L., Virla E. G. and Toledo A. 2001. Leafhoppers species richness and abundance on corn crops in Argentina (Insecta-Hemiptera-Cicadellidae). Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. Madrid. 27:465-474.
- Paradell S., Virla E., Remes Lenicov A. M., Giménez Pecci M. P., Catalano M.I. Laguna I. G. y Murúa L. 2005. Cicadélidos sobre cultivos de maíz y la maleza asociada en áreas afectadas por Corn Stunt Spiroplasma (CSS) de las provincias de la zona centro de Argentina (Hemíptera-Auchenorrhyncha). VIII Congreso Nacional de Maíz. Rosario. Argentina. 296-299.
- Remes Lenicov, A. M. M., Teson A., Dagoberto E. y Huguet N. 1985. Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto del Maíz. Gaceta Agronómica. 25: 251-258.
- SMN - Boletín climatológico. 2006. Volumen anual 2006. Publicado en Internet, disponible en: <http://www.smn.gov.ar/?mod=clima&id=50>. Activo Octubre 2009.
- SMN - Boletín climatológico. 2005. Volumen anual 2005. Publicado en Internet, disponible en: <http://www.smn.gov.ar/?mod=clima&id=50>. Activo Octubre 2009.
- Surfer. 1997. Surface Mapping System. Version 6.04. Golden Software, Inc.
- Virla E., Remes Lenicov A. M. M. y Paradell S. 1991. Presencia de *Dalbulus maidis* (Insecta, Homoptera, Cicadellidae) sobre maíz y teosinte en la Argentina. Revista de Facultad de Agronomía, La Plata. 67: 23-30.
- Virla E. G., Paradell S. L. y Diez P. A. 2003. Estudios bioecológicos sobre la chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (Insecta-Cicadellidae) en Tucumán (Argentina). Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. Madrid. 29:17-25.
- Virla E. G., Díaz C. G., Carpane P., Laguna I. G., Ramallo J., Gerónimo Gómez L. y Giménez Pecci M. P. 2004. Evaluación preliminar de la disminución en la producción de maíz causada por el "Corn Stunt Spiroplasma" (CSS) en Tucumán, Argentina. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. 30: 403-413.
- Whitcomb R. F., Chen T. A., Williamson D. L., Liao C., Tully J. G., Bové J. M., Mouches C., Rose D. L., Coan M. E. and Clark T. 1986. *Spiroplasma kunkelii* sp. nov.: Characterization of the etiological agent of corn stunt disease. International Journal of Systematic Bacteriology. 36(2): 170-178.

CAPÍTULO 3

ENSAYOS DE TRANSMISIÓN DE *Spiroplasma kunkelii* CON CICADÉLIDOS ENDÉMICOS DE ARGENTINA

INTRODUCCIÓN

El “achaparramiento del maíz” es una enfermedad del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) causada por *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb *et al.*, 1986). La chicharrita del maíz, *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae) es considerada la principal especie vectora por su elevada eficiencia en la transmisión (Madden y Nault, 1983; Alivizatos y Markham, 1986) y su amplia distribución geográfica (Triplehorn y Nault, 1985; Oliveira *et al.*, 2004; Paradell *et al.*, 2001). Sin embargo, en algunas oportunidades (Capítulo 2) se ha detectado presencia de la enfermedad pero no se encontraron individuos de *D. maidis*, lo que sugiere que otras especies de insectos podrían ser vectores del patógeno. Al respecto, en Argentina se han reportado más de 31 especies de cicadélidos (Paradell, 1995) que podrían ser vectores de *S. kunkelii*, por lo que en este capítulo, se describen estudios tendientes a esclarecer la posible existencia de otro vector diferente a *D. maidis* en Argentina.

Diversas especies han sido evaluadas para determinar si son vectoras de *S. kunkelii*. En condiciones controladas se logró transmisión de *S. kunkelii* con *Dalbulus maidis* DeLong y Wolcott, *D. guevarai* DeLong, *D. gelbus* DeLong, *D. quinquenotatus* DeLong y Nault, *D. tripsacoides* DeLong y Nault, *D. elimatus* Ball, *Baldulus tripsaci* Kramer y Whitcomb (Madden y Nault, 1983), *D. longulus* DeLong (Nault *et al.*, 1984), *Exitianus exitiosus* Uhler, *Graminella nigrifrons* Forbes (Nault, 1980; Bratfute *et al.*, 1981) y *Stirellus bicolor* Van Duzee (Nault, 1980). En Argentina *D. maidis* ha sido mencionada como la única especie

presente del género *Dalbulus* (Virla *et al.*, 1991; Paradell *et al.*, 2001; Paradell 1995).

S. kunkelii se encuentra en el floema de las plantas que infecta (Davis *et al.*, 1972; Nome *et al.*, 2009) y puede ser adquirido por *D. maidis* después de 25 minutos de alimentación (Alvizatos y Markham, 1986). Cuando los espiroplasmas ingresan al cuerpo del insecto, se multiplican y circulan hasta alcanzar las glándulas salivales accesorias (Kwon *et al.*, 1999; Özbek *et al.*, 2003; Ammar y Hogenhout, 2005). Dicho lapso es el período de latencia en *D. maidis*, que puede variar entre 17 y 23 días (Nault, 1980). Una vez que *S. kunkelii* es adquirido, el vector permanece infectivo durante toda su vida (Nault, 1980; Alvizatos y Markham, 1986). Para poder ser inoculado a otras plantas, el patógeno debe ser introducido al floema de una nueva planta durante la alimentación (Fletcher *et al.*, 1998; Bové *et al.*, 2003). La eficiencia de transmisión de estos insectos es variable, siendo *D. maidis* la especie más eficiente (Nault, 1980; Madden y Nault, 1983). La inoculación puede ocurrir después de solamente una hora de alimentación del insecto (Alvizatos y Markham, 1986) y su eficiencia aumenta con el tiempo hasta llegar cerca del 100%.

En plantas de maíz los síntomas de *S. kunkelii* requieren un periodo de latencia para comenzar a expresarse. Dependiendo de la temperatura y del cultivar, los primeros síntomas comienzan a observarse entre 3 y 4 semanas luego de finalizado el período de inoculación (Bratfute *et al.*, 1981; Nault, 1980). Los síntomas típicos en las plantas son estrías cloróticas que se inician desde la base de las hojas (Nault, 1980). En condiciones de campo, el desarrollo del cuadro sintomatológico es variable, y las diferencias pueden deberse al clima, al cultivar y a la edad de la planta al momento de infección (Massola Junior *et al.*, 1999; Bedendo, 1999).

En la mayoría de los casos, la distribución geográfica de los patógenos transmitidos por insectos en maíz, está determinada por la distribución de sus

vectores y de sus plantas hospedantes (Lopes y Oliveira, 2004). En el caso particular de *S. kunkelii*, el rango de plantas hospedantes naturales del patógeno esta limitado a muy pocas especies del género *Zea* sp. (Nault, 1980). Esto puede estar dado por las preferencias alimenticias de *D. maidis* su principal especie vectora (Markham, 1983; Fletcher *et al.*, 2006). Sin embargo, el hecho de que *S. kunkelii* pueda colonizar ciertas dicotiledóneas cuando se utiliza *Euscelidius variegatus* Kirschbaum como vector en condiciones experimentales (Markham *et al.*, 1977; Alivizatos, 1984), sugiere que la gama de plantas hospedantes de *S. kunkelii* puede ser mayor.

Estudios realizados en Argentina, han indicado la presencia de *D. maidis* en varias provincias del norte donde se cultiva maíz (Paradell *et al.*, 2001; Giménez Pecci *et al.*, 2002a; 2003; Virla *et al.*, 2003; Albarracin *et al.*, 2008). Sin embargo, la no detección del principal vector en algunos lotes afectados por el achaparramiento ubicadas en la región agrícola central (Capítulo 2), podrían suponer la presencia de otra especie diferente a *D. maidis* como vector de *S. kunkelii*. *D. maidis* no es la única chicharrita asociada al cultivo de maíz (Albarracin *et al.*, 2008), habiéndose mencionado 31 especies de cicadélidos relacionadas al cultivo (Paradell, 1995).

Paradell *et al.* (2001) observaron que sobre maíz hay especies de insectos que ocurren al norte del paralelo de latitud 30° S y otras al sur del mismo. La especie más frecuente y abundante en la región subtropical fue *D. maidis*, mientras que en la región agrícola central del país al sur del paralelo de latitud 30° S la especie más frecuente fue *Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859). Este cicadélido se encuentra ampliamente distribuido en Argentina, donde se lo registra con mayor frecuencia en maíz y malezas asociadas al cultivo (Paradell *et al.*, 2001; 2005; Remes Lenicov *et al.*, 2006).

En América del norte, *E. exitiosus* actúa como transmisor de *S. kunkelii* (Nault, 1980). En nuestro país, *E. obscurinervis* es la única especie del género, y su distribución en áreas afectadas por achaparramiento del maíz hacen suponer un

rol en la epidemiología de esta enfermedad (Paradell *et al.*, 2001; 2005; Virla, 2000). La existencia de un insecto diferente a *D. maidis* con capacidad de transmitir a *S. kunkelii* tendría implicaciones epidemiológicas importantes en la enfermedad. Como por ejemplo, justificar la presencia de la enfermedad en áreas donde no se encuentra *D. maidis* y la posibilidad de la existencia de nuevos hospedantes alternativos para ese patógeno.

En base a lo planteado, en este capítulo se estudian transmisiones con diferentes especies de cicadélidos para determinar si existe en Argentina otro vector diferente de *D. maidis* con capacidad de transmitir *S. kunkelii* a plantas de maíz.

MATERIAL Y MÉTODOS

La cría de insectos se realizó en invernadero en el Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE), Córdoba, Argentina. Los insectos se mantuvieron en jaulas de aluminio de 80 x 50 x 25 cm con paredes de voile. Las mismas se colocaron en condiciones controladas de temperatura (24-27 °C), fotoperíodo (16 h de luz natural suplementada con luz artificial y 8 h de oscuridad) y humedad relativa (70-80%).

3.1.- Obtención del vector y del aislamiento del patógeno

El aislamiento inicial de *S. kunkelii* para los ensayos de transmisión se obtuvo de plantas de maíz sintomáticas infectadas empleando *D. maidis* recolectados en la localidad de El Manantial, provincia de Tucumán. La presencia de *S. kunkelii* en plantas de maíz fue corroborada mediante la técnica “Reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) según se describe en el ítem 3.3. El aislamiento, denominado Tucumán 1, no tuvo reacción positiva para Maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) ni para *Maize rayado fino virus* (MRFV), patógenos

transmitidos por el mismo vector (Nault, 1980; Nault *et al.*, 1980), de acuerdo a las técnicas de PCR y PTA-ELISA, respectivamente.

El aislamiento de patógeno se mantuvo mediante transmisión con insectos de acuerdo a Nault (1980) en invernadero y en la figura 3.1 se observan los pasos seguidos para este procedimiento. Como vector se emplearon individuos de la especie *D. maidis* criados en condiciones controladas, recolectados en cultivos de maíz en El Manantial. Estos se colocaron en jaulas por 48 h y se utilizaron para iniciar las colonias sanas de acuerdo a Lopes y Oliveira (2004) con modificaciones (Fig. 3.2). En dichas jaulas se colocaron 4 macetas plásticas con plantas de maíz cv. Pop Zélia en estado de desarrollo de 1 a 3 hojas, que sirvieron como alimento y lugar de oviposición. Las colonias se obtuvieron a partir de ninfas recién emergidas de huevos extraídos de estas plantas colocadas en cajas de Petri con papel de filtro humedecido. Estas colonias fueron mantenidas en jaulas que contenían plantas sanas de maíz cv. Pop Zélia en estado de desarrollo de 4 a 6 hojas. Periódicamente se reemplazaron las plantas para mantener un suministro constante de plantas frescas.

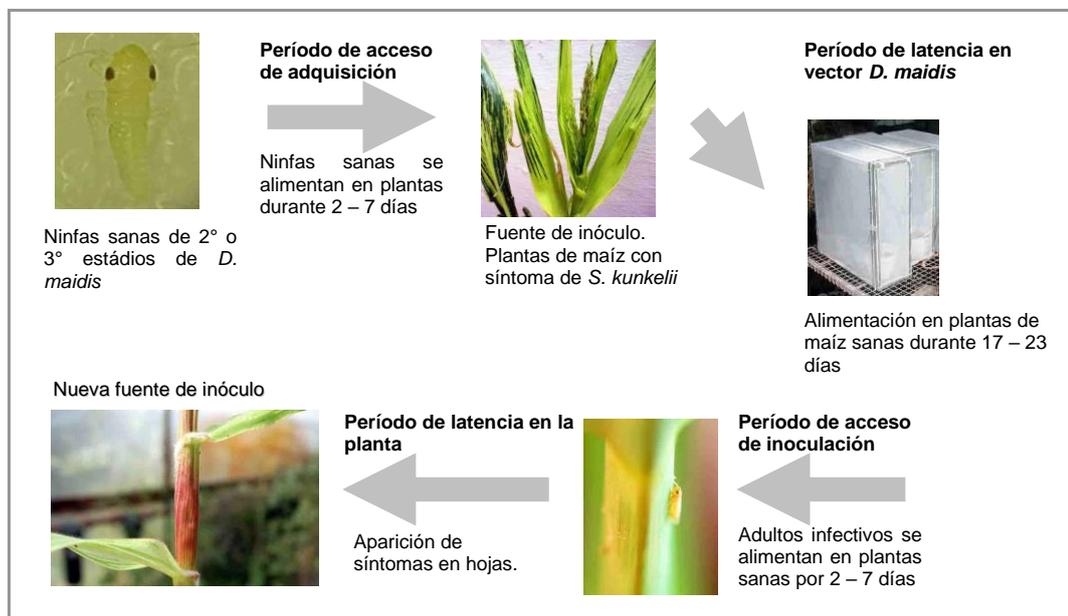


Fig. 3.1. Obtención y manutención del aislamiento de *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) mediante transmisión con *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) en invernadero.

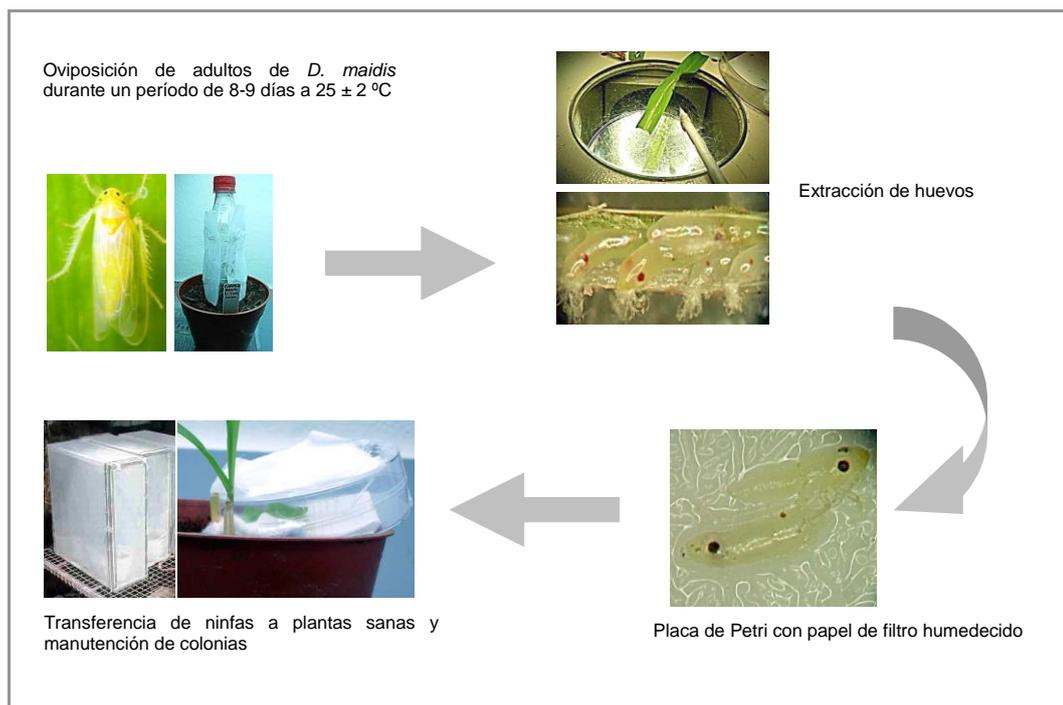


Fig. 3.2. Obtención de colonias sanas de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) en invernadero.

3.2.- Ensayos de transmisión con potenciales vectores

3.2.1.- Ensayos de transmisión con cicadélidos colectados a campo

Durante las campañas agrícolas 2004/05 y 2005/06 se colectaron insectos con red entomológica de arrastre en lotes de maíz en El Manantial, Tucumán. Se probaron individuos de 5 especies de cicadélidos (Tabla 3.1), *Hortensia similis* (Walker, 1851), *Xerophoea viridis* (Fabricius, 1794), *Clorotetix sp.*, *Plesiommata mollicella* (Fowler, 1900) y *Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859). El transporte de los insectos se realizó en jaulas plásticas con hojas de maíz y papel absorbente humedecido para evitar la desecación durante el transporte. Los experimentos de inoculación se realizaron en el INTA IFFIVE (Córdoba). Los insectos provenientes de campo se separaron individualmente y se colocaron durante 7 días sobre plantas de maíz cv. Pop Zélia al estado de una hoja desplegada. Luego de este período, las plantas se mantuvieron en invernadero y fueron evaluadas semanalmente para detectar la presencia de síntomas de la enfermedad. Los

individuos fueron identificados en la Cátedra de Entomología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Plata (UNLP), Argentina.

3.2.2.- Ensayos de transmisión con individuos de *Exitianus obscurinervis* criados en condiciones controladas

Para la cría de estos insectos, se utilizó la metodología descrita por Virla (1990a y 1990b) con modificaciones. Se emplearon individuos de la especie de *Exitianus obscurinervis* recolectados en El Manantial durante la campaña agrícola 2005/06. Para la obtención de colonias sanas, los insectos adultos se colocaron en jaulas con plantas sanas durante un período de 7 días, luego del cual se retiraron. Las ninfas recién eclosionadas se retiraron con la ayuda de un aspirador bucal y se llevaron a jaulas de cría hasta la etapa de adultos. Como fuente de alimento y lugar de ovipostura se utilizó una mezcla de las siguientes plantas: maíz (*Zea mays* L.), gramilla (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.), sorgo de alepo (*Sorghum halepense* L. Pers.), avena (*Avena sativa* L.), cebadilla criolla (*Bromus unioloides* HBK) y pata de gallina (*Digitaria* sp). Las plantas fueron reemplazadas semanalmente y las que estuvieron en contacto con los insectos, se mantuvieron en invernadero para comprobar la condición de plantas sanas mediante la observación de síntomas y serología. La colonia se mantuvo durante un período de 90 días, plazo a partir del cual se consideró sana.

Para adquirir *S. kunkelii* a partir de plantas de maíz con síntomas, se colocaron aproximadamente 150 adultos sanos de *E. obscurinervis* durante 4 días. Luego de este período, los insectos fueron removidos y las plantas colocadas en jaulas en invernadero. Las ninfas procedentes de los huevos colocados por los insectos se mantuvieron sobre las plantas con síntomas de *S. kunkelii* durante 10 a 14 días desde la emergencia de las primeras ninfas, considerado período de adquisición. Transcurrido éste, y utilizando un succionador, las ninfas se trasladaron hacia jaulas con plantas sanas de *Z. mays*, *C. dactylon*, *S. halepense*, *A. sativa*, *B. unioloides* y *Digitaria* sp. donde permanecieron por un período de incubación de 21 días. Los individuos sobrevivientes se utilizaron para realizar

inoculaciones en plantas de maíz cv. Pop Zélia, en estado de 1 a 3 hojas. Estas plántulas se cubrieron con jaulas construidas con botellas plásticas desechables de 2 litros, con aberturas recubiertas de voile. Dentro de estas, fueron depositados 3 insectos por planta, durante un período de inoculación de 7 días. Como control sano se utilizó la misma cantidad de insectos en 5 plantas de maíz del mismo cultivar, provenientes de colonias sanas.

Al finalizar el período de inoculación, los insectos se retiraron de las plantas y se conservaron a -20 °C hasta determinar la presencia de *S. kunkelii* mediante la técnica de PCR. Algunos de los insectos utilizados en la transmisión fueron sumergidos en fijador glutaraldehído/paraformaldehído 2,5% en tampón cacodilato 0,5 M para ser analizados en microscopía electrónica. Las plantas se colocaron en invernadero y fueron pulverizadas semanalmente con insecticida. Durante el ensayo, la temperatura media del invernadero fue de 25 ± 3 °C día y 18 ± 3 °C noche.

3.3.- Evaluación de síntomas y detección del patógeno en plantas e insectos

La transmisión del patógeno en plantas fue determinada por la presencia de síntomas típicos de achaparramiento (Nault, 1980) y mediante la técnica serológica de DAS-ELISA, utilizando antisueros comerciales provistos por AGDIA Inc, USA (Capítulo 2). Para ello las plantas de maíz fueron mantenidas en invernadero observando el desarrollo de síntomas. A los 90 días de finalizar el periodo de inoculación (estado reproductivo) o al observar indicios de muerte de las plantas, se tomaron muestras de la penúltima hoja desplegada y se conservaron a -20 °C hasta determinar la presencia del patógeno por serología.

La presencia de *S. kunkelii* en los insectos se confirmó mediante la técnica PCR. Los 3 insectos utilizados en la transmisión de cada planta, se colocaron en un microtubo de 1,5 ml. La extracción de ácidos nucleicos se realizó de acuerdo a Doyle y Doyle (1994) con modificaciones según se describe a continuación. Cada

muestra se maceró con 500 µl de tampón CTAB (TrisHCl 0,1 M pH 8,0, NaCl 1,4 M, EDTA 0,02 M pH 8,0, CTAB 2 gr/100 ml) y 1 µl de β-mercaptoetanol. Las muestras fueron incubadas a 65 °C por 30 min homogenizando cada 5-10 min. Luego de enfriar a temperatura ambiente durante 1 min, se le agregó 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24/1 v/v) y se agitó en vortex durante 30 seg. Se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante (300 µl) se colocó en un nuevo tubo con 180 µl de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol 70% (v/v), se secó y resuspendió en 30 µl de tampón TE (Tris Cl 0,01 M, EDTA 0,01 M pH 8,0).

La amplificación del gen de la espiralina de *S. kunkelii* se realizó siguiendo el método de Barros *et al.* (2001). Se amplificó el DNA extraído de los insectos utilizando los iniciadores CSSF2/CSSR6 (CSSF2: 5´-GGCAAAGATGTAACA AAAGT-3´ y CSSR6: 5´-GTTACTTCAACAGTAGTTGCG-3´). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl, conteniendo 1 µl de DNA (20 a 200 ng), 1X de tampón (Tris-HCl 6 mM pH 8,8, KCL 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada iniciador y 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). La amplificación se realizó en un termociclador (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Alemania) y los parámetros de ciclado fueron: 94 °C por 2 min, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 2 min, 72 °C por 2 min, con extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa 1,4% junto a un marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Promega Corp.) y se tiñeron con bromuro de etidio para su visualización bajo luz ultravioleta.

Adicionalmente, un grupo de insectos que inoculó el patógeno se observó con microscopio electrónico de transmisión (MET) (JEOL JEM EXII) luego de procesarlos utilizando protocolos de Kitajima (1997) y Maunsbach (1998) con modificaciones. Los insectos fueron sumergirlos en fijador gluteraldehído/paraformaldehído 2,5% (v/v) en tampón cacodilato 0,5 M. Luego, se les extrajeron las cabezas donde se encuentran las glándulas salivales y se enjuagaron

con agua destilada 3 veces durante 5 min. Se colocaron en solución de acetato de uranilo 0,5% (v/v) durante toda la noche. Posteriormente se lavaron y deshidrataron en una serie de diluciones de etanol durante 10 min cada una (50%, 70%, 90% v/v) y finalmente 10 min de etanol 100%. Los tejidos fueron preincluidos en una solución que contenía igual cantidad de resina Spurr y etanol 100% (v/v) durante 12 h. Finalmente fueron incluidos en resina pura, y polimerizados en cámara con luz ultra violeta a 4 °C durante 72 h. Los cortes ultrafinos (70 nm), obtenidos con ultramicrotomo (RMCMT6000-XL), se colocaron sobre rejillas de cobre de 50 mesh. Las rejillas fueron tratadas con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron al MET a 80 kV.

Para identificar los espiroplamas en las glándulas de los insectos, los cortes ultrafinos fueron inmunomarcados con partículas de oro de 10 nm (Sigma-Aldrich). Las rejillas fueron bloqueadas a temperatura ambiente, usando PBS (1mM KH₂PO₄; 8 mM Na₂HPO₄; 0,13 M NaCl; 3 mM KCl) + BSA 1% (Suero Fetal Bovino) durante 30 min. Luego se incubaron durante 2 h sobre gotas de PBS y antisuero policlonal (dilución 1/10 v/v) para *S. kunkelii* obtenido por Giménez Pecci *et al.*, 2009. Después de 5 lavados con PBS, fueron nuevamente incubadas durante 1 h sobre gotas de suero anti-IgG conjugado con oro coloidal (cabra anti-conejo) (Sigma- Aldrich) diluida 1/10 v/v en PBS. Finalmente los cortes fueron observados en el microscopio electrónico de transmisión.

RESULTADOS

3.2.- Ensayos de transmisión con potenciales vectores

3.2.1.- Ensayos de transmisión con cicadélidos colectados a campo

Ninguno de los insectos recolectados en condiciones naturales de los 5 géneros empleados en los ensayos de transmisión inoculó el patógeno (Tabla 3.1), ya que ninguna de las plantas utilizadas en estos ensayos desarrolló síntoma de la

enfermedad. Además, las pruebas serológicas no detectaron la presencia de *S. kunkelii* en las 133 plantas donde se alimentaron estos insectos (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Transmisiones experimentales de *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) bajo condiciones controladas, utilizando cicadélidos recolectados a campo en los años 2005 y 2006.

Provincia	Localidad	Especie de insectos	Fecha	Número de insectos	Número de plantas (*)
Tucumán	El Manantial	<i>Exitianus obscurinervis</i>	16/02/2005	8	0/8
		<i>Hortensia similis</i>	16/02/2005	21	0/21
		<i>Plesiommata mollicella</i>	16/02/2005	51	0/51
		<i>Xerophoea viridis</i>	16/02/2005	3	0/3
		<i>Clorotetix sp</i>	16/02/2005	18	0/18
		<i>Exitianus obscurinervis</i>	17/02/2006	16	0/16
		<i>Hortensia similis</i>	17/02/2006	8	0/8
		<i>Plesiommata mollicella</i>	17/02/2006	8	0/8
Total				133	0/133

(*) Número de plantas de maíz (*Zea mays* L.) positivas para *S. kunkelii* sobre el total analizadas por serología.

3.2.2.- Ensayos de transmisión con individuos de *Exitianus obscurinervis* criados en condiciones controladas

El aislamiento inicial de *S. kunkelii* fue transmitido en condiciones controladas por la especie *Exitianus obscurinervis* (Fig. 3.3) a plantas de maíz cv. Pop Zélia. De un total de 11 plantas que estuvieron en contacto con insectos alimentados de plantas enfermas, en grupos de 3 individuos por planta, el patógeno fue inoculado a 7 de ellas (Tabla 3.2). Este valor, representa el 63% de plantas inoculadas.



Fig. 3.3. Adulto de *Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859) alimentándose en planta de maíz (*Zea mays* L.).

3.3.- Evaluación de síntomas y detección del patógeno en plantas e insectos

En las 7 plantas con síntomas del achaparramiento de maíz, la presencia del patógeno fue confirmada mediante la técnica DAS-ELISA, mientras que en las 5 plantas de maíz inoculadas con insectos de colonias sanas no se observaron síntomas de *S. kunkelii* ni se detectó el patógeno por serología.

Las plantas de maíz que estuvieron en contacto con *E. obscurinervis* inoculativos mostraron los síntomas típicos de la enfermedad causados por *S. kunkelii* y fueron similares a los descritos previamente (Nault, 1980). Los síntomas aparecieron alrededor de los 60 días después de finalizado el periodo de inoculación y comenzaron con estrías cloróticas en los bordes de la base de las hojas jóvenes. Luego la clorosis aumentó hasta cubrir a toda la hoja y se extendió a todas las hojas que se desarrollaron subsecuentemente (Fig. 3.4). A los 90 días cuando se dio por concluido el ensayo, todas las plantas positivas por DAS-ELISA presentaron síntomas típicos de la enfermedad. Algunas plantas desarrollaron un crecimiento achaparrado, debido a un acortamiento de los entrenudos superiores. Además, pudo observarse bordes recortados de las hojas superiores (Fig. 3.4). En ninguna de las plantas se observó enrojecimiento de los márgenes de las hojas (Carpane *et al.*, 2006). Algunas plantas no llegaron al día 90, ya que la mayoría de ellas presentaron un deterioro prematuro después de alcanzar el estado reproductivo o los síntomas típicos de la enfermedad.



Fig. 3.4. Síntomas del achaparramiento del maíz causados por *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) en plantas de maíz (*Zea mays* L.) cv. Pop Zélia, obtenidos mediante transmisiones experimentales con *Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859). A-C) típicas estrías cloróticas partiendo de la base de las hojas. D) planta con síntomas severos de achaparramiento. E-G) detalle (flecha) de: E) acortamiento de entrenudos, F) acartuchamiento de hojas, G) corte longitudinal y H) bordes recortados.

La presencia de *S. kunkelii* en *E. obscurinervis* se corroboró mediante PCR (Fig. 3.5). Un fragmento de aproximadamente 500 pb fue amplificado por PCR desde la muestra de DNA extraída de los insectos (3 insectos cada muestra) y las 7 muestras fueron encontradas positivas para *S. kunkelii*, utilizando los iniciadores CSSF2/R6, específicos para *S. kunkelii* (Barros *et al.*, 2001).

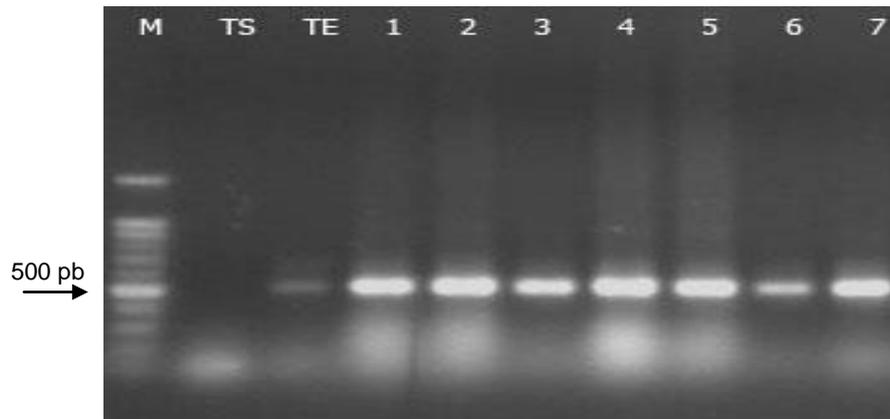


Fig. 3.5. Identificación y detección de *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) en *Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859) utilizados como vectores experimentales. Electroforesis en gel de agarosa 1,4 %. Producto de PCR (500 pb) obtenidos con par de iniciadores específicos (CSSF2/R6) para *S. kunkelii*. M: Marcador de peso molecular. TS: Testigo sano (ADN de *E. obscurinervis* sano). TE: Testigo enfermo (Planta de maíz experimentalmente inoculada con el aislamiento T1). Calles 1-7: ADN derivado de 7 muestras de *E. obscurinervis* (3 insectos/muestra) experimentalmente inoculados con *S. kunkelii*.

La identificación de *S. kunkelii* con el MET en individuos de *E. obscurinervis* que transmitieron el patógeno se realizó en base tamaño, morfología e inmunomarcación en los tejidos de glándulas salivares (Fig. 3.6). Se observaron cuerpos tipo espiroplasmas en los cortes ultrafinos de los insectos infectivos, cuya dimensión promedio fue de 263,5 nm de diámetro ($\pm 74,5$ nm). Estos cuerpos redondeados o pleomórficos, están rodeados por una membrana conteniendo ribosomas y material fibrilar (DNA) (Fig. 3.7). Además, se observaron dentro de vesículas constituidas por una membrana.

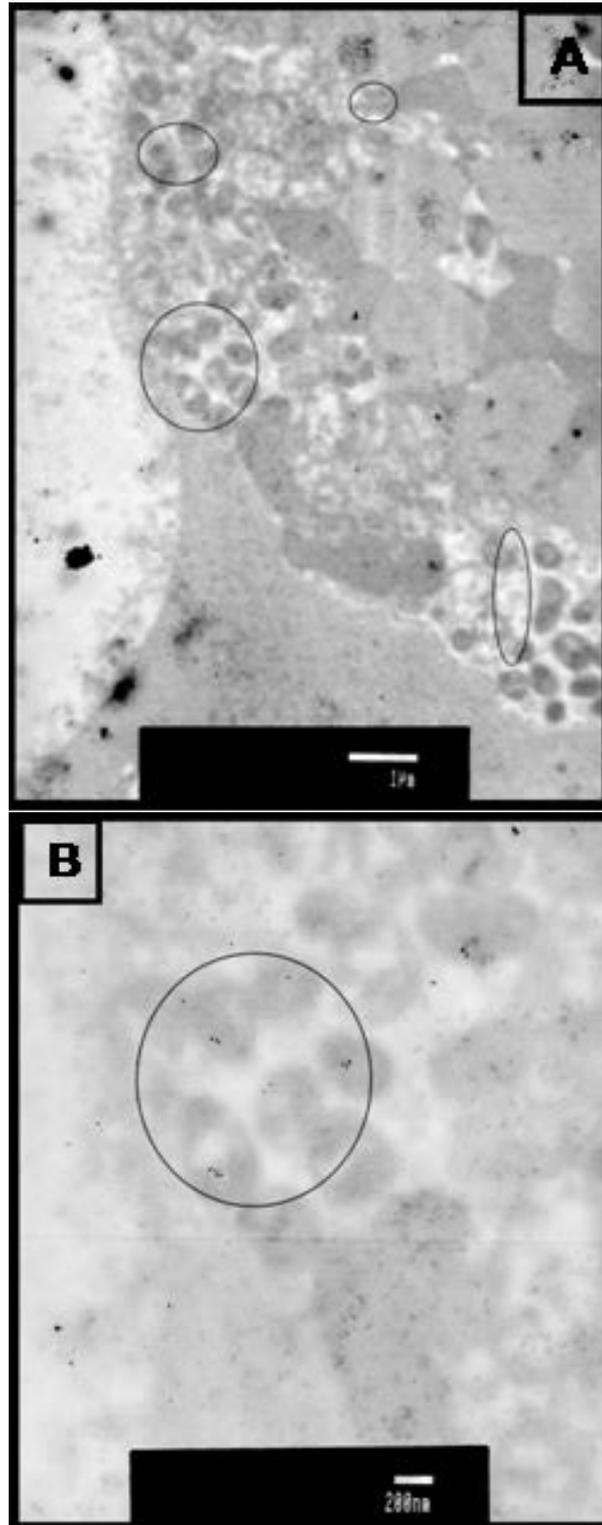


Fig. 3.6. Técnica de inmunomarcación con oro usando antisuero específico para *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb). Confirmación de *S. kunkelii* en las glándulas salivales de *Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859). A. Los círculos indican las partículas de oro sobre los espiroplasmas. Secciones ultrafinas incubadas con anticuerpo policlonal para *S. kunkelii*. B. Detalle de la figura A (flecha). Barra = 1 μ m y 200 nm en figura A y B, respectivamente.

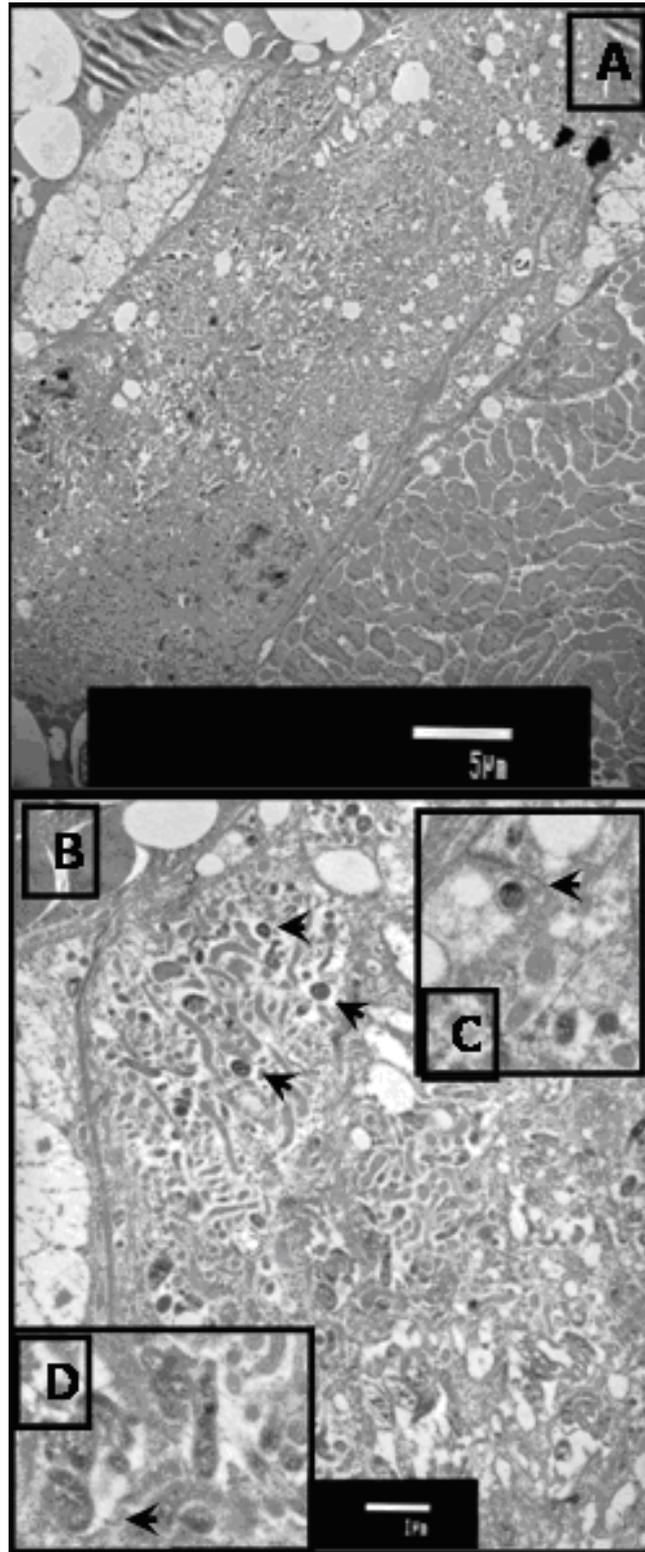


Fig. 3.7. A: Vista general de glándulas salivares de *Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859) infectadas con *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb). B: Detalle de A, las flechas indican espiroplasmas. Espiroplasma individual dentro de vesículas (C) y rodeados por una simple membrana (D). Barra = 5µm y 1µm en figura A y B, respectivamente.

Tabla 3.2. Detección de *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) en plantas de maíz (*Zea mays* L.) cv. Pop Zélia transmitidas bajo condiciones controladas utilizándose una densidad de 3 individuos de *Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859) como vectores.

Detección de <i>Spiroplasma kunkelii</i>			
Plantas	Síntomas	DAS-ELISA	PCR
1	-	-	+ ^b
2	+	+	+
3	-	-	(*)
4	-	-	+
5	-	-	+
6	+	+	+
7	+	+	(*)
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	(*)
11	+	+	(*)
Control	0/5	0/5	(*)

Plantas positivas (+) y negativas (-) por síntomas y DAS-ELISA. 0/5: Número de plantas infectadas / número de transmisiones (Testigo sano). La presencia del patógeno en el insecto (b) se confirmó mediante la técnica PCR. (*): Insectos a los cuales no se le realizó PCR y se colocaron en fijador para ser observados por microscopía electrónica.

DISCUSIÓN

Durante la campaña agrícola 2005/06, insectos de cinco géneros de chicharritas, *H. similis*, *X. viridis*, *Clorotetix sp.*, *P. mollicella* y *E. obscurinervis*, se utilizaron en ensayos de transmisión para determinar si estas especies son vectores de *S. kunkelii* a campo. Sin embargo, no se pudieron encontrar insectos infectivos. Considerando que el principal vector, *D. maidis*, presenta un porcentaje de individuos inoculativos de *S. kunkelii* en Tucumán del 0,70 % (Capítulo 4) y en este ensayo se utilizaron un total de 133 insectos, no es posible descartar a estas especies como vectores de *S. kunkelii*, debido al número insuficiente de insectos utilizados en las pruebas.

Por otro lado, en transmisiones experimentales se comprobó que *E. obscurinervis* es vector de *S. kunkelii*. Este hallazgo se corrobora por la

sinomatología de las plantas inoculadas, detección del patógeno por serología en plantas y por PCR en el insecto, y por la aparición de corpúsculos similares a mollicutes en microscopia electrónica que reaccionaron serológicamente en inmunomarcación con antisuero para *S. kunkelii*. El hecho de que *S. kunkelii* fue adquirido de una planta con síntomas y transmitido a plantas sanas de maíz, involucra al insecto como vector experimental y sugiere que puede ser un vector a campo.

Las estrías cloróticas en la base de las hojas desarrolladas en las plantas de maíz transmitidas con *E. obscurinervis*, confirman la presencia de *S. kunkelii*. Los primeros síntomas empezaron a ser visibles a partir de las 6 semanas de concluido el período de transmisión. Este tiempo, extiende dos semanas al intervalo reportado previamente por otros autores (Nault, 1980; Carpane *et al.*, 2006), quienes trabajaron con temperaturas similares (temperatura media: 27 °C día - 18 °C noche). En este trabajo, la temperatura media durante el ensayo fue menor y varió entre 25 ± 3 °C día y 18 ± 3 °C noche. En este sentido, Nault (1980) indica que el tiempo requerido en la expresión de los síntomas causados por *S. kunkelii* depende de la temperatura, pudiendo acortarse o alargarse si las plantas son sometida a altas o bajas temperaturas respectivamente. Es posible que el retraso observado en la expresión de los primeros síntomas, se deba a la menor temperatura en la cual fue conducido este experimento.

En este trabajo, se confirmó mediante inmunomarcación la presencia de *S. kunkelii* en las glándulas salivales de *E. obscurinervis*. Este resultado indica que *S. kunkelii* infesta las glándulas salivales de *E. obscurinervis* del mismo modo que en *D. maidis* (Ammar y Hogenhout, 2005) y que *S. citri* en *Circulifer tenellus* (Wayadande y Fletcher, 1995; Kwon *et al.*, 1999). Este hecho sugiere que, al igual que en los otros sistemas espiroplasma-vector mencionados, *E. obscurinervis* inocula *S. kunkelii* a plantas de maíz durante su alimentación en floema (Fletcher *et al.*, 1998; Bové *et al.*, 2003). Adicionalmente, la observación de cortes ultrafinos de glándulas salivares de *E. obscurinervis*, en aquellos insectos que transmitieron el patógeno, permitieron confirmar la presencia de cuerpos de

tamaño y forma similar a descriptas para *S. citri* y *S. kunkelii* anteriormente (Kwon *et al.*, 1999; Özbek *et al.*, 2003).

E. obscurinervis tiene una distribución geográfica más amplia en Argentina que *D. maidis*, incluyendo el área templada (Paradell *et al.*, 2001; Remes Lenicov *et al.*, 2006), encontrándolo normalmente en el cultivo y en malezas aledañas (Paradell, 1995; Paradell *et al.*, 2005; Albarracin *et al.*, 2008). Por otra parte, es capaz de adquirir y transmitir *S. kunkelii* desde y a plantas de maíz. Estas evidencias sugieren que esta especie podría tener un rol importante en la transmisión de *S. kunkelii*, pudiendo ser vector en áreas donde no ha sido observada la principal especie vectora, *D. maidis*. Tal sería el caso de la región agrícola central de Argentina, al sur del paralelo de latitud 30° S donde *E. obscurinervis* es la especie más frecuente, se encuentra en el 90% de las localidades monitoreadas (Paradell *et al.*, 2001) y se ha detectado la presencia de la enfermedad (Capítulo 2).

Otro aspecto importante a tener en cuenta de este nuevo vector, es la posibilidad de que otras especies de plantas diferentes al maíz puedan hospedar a *S. kunkelii*. En las enfermedades causadas por espiroplasmas, se sugirió que el rango de hospedantes vegetales está necesariamente incluido dentro del rango de hospedantes del insecto vector (Markham, 1983; Fletcher *et al.*, 2006). En el caso particular de *S. kunkelii*, las plantas mencionadas como hospedantes naturales a campo están circunscriptas dentro del género *Zea* (Nault, 1980), posiblemente porque *D. maidis* se alimenta sólo de representantes de este género (Prite, 1967; Nault y DeLong, 1980). Sin embargo, en ensayos realizados en condiciones controladas utilizando a *Euscelidius variegatus* Kirschbaum como vector, se pudo inocular *S. kunkelii* a seis especies de dicotiledóneas (Markham *et al.*, 1977; Alivizatos, 1984). Como *E. obscurinervis* ha sido criado exitosamente en sorgo (*Sorghum vulgare* L.), cebadilla (*Bromus* sp.) (Virla, 1990a) y trigo (*Triticum aestivum* L.) (Virla, 1990b), y ha sido encontrado a campo sobre un amplio rango de plantas silvestres y cultivadas (Paradell, 1995, Paradell *et al.*, 2005; Remes

Lenicov *et al.*, 2006) es posible que el rango de especies vegetales que son reservorio del patógeno sea más amplio de lo que se conoce actualmente.

Este trabajo demuestra por primera vez la capacidad de transmitir *S. kunkelii* utilizando como vector a *E. obscurinervis* en condiciones experimentales. Este descubrimiento abre la posibilidad de que *E. obscurinervis* sea un vector de *S. kunkelii* en condiciones naturales. Este hecho traería importantes implicaciones epidemiológicas que deberían ser evaluadas para comprender mejor el patosistema de achaparramiento del maíz en Argentina.

CONCLUSIÓN

Exitianus obscurinervis es un vector experimental de *S. kunkelii*, puesto que adquiere espiroplasmas desde plantas de maíz infectadas y lo transmite a plantas sanas.

BIBLIOGRAFÍA

- Albarracin E. L., Paradell S. and Virla E. G. 2008. Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha) associated with maize crops in northwestern Argentina, influence of the sowing date and phenology of their abundance and diversity. *Maydica* 53(3-4): 289-296.
- Alvizatos A. 1984. Corn stunt Spiroplasma in dicotyledonous plants. *Journal of Phytopathology*. 110: 148-155.
- Alvizatos A. and Markham P. 1986. Acquisition and transmission of corn stunt Spiroplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. *Annals of Applied Biology*. 108: 535-544.
- Ammar E. D. and Hogenhout S. A. 2005. Immunofluorescence confocal laser scanning microscopy as a reliable method for studying the distribution of mollicutes in vector leafhoppers (Cicadellidae: Hemiptera) and in host plants. *Annals of the Entomological Society of America*. 98: 820-826.
- Barros T., Davis R., Resende R. and Dally E. 2001. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt Spiroplasma. *Plant Disease*. 85: 475-480.
- Bedendo I. P. 1999. Enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho associados a fitoplasma e espiroplasma: sintomatologia, etiologia e técnicas para detecção e identificação destes agentes. *Summa Phytopathologica*. 25: 190-196.
- Bové J. M., Renaudin J., Saillard C., Foissac X. and Garnier M. 2003. *Spiroplasma citri*, a plant pathogenic mollicute: Relationships with Its Two Hosts, the Plant and the Leafhopper Vector. *Annual Review of Phytopathology*. 41: 483-500.
- Bradford O. E., Tsai J. H. and Gordon D. T. 1981. Corn stunt Spiroplasma and viruses associated with a maize disease epidemic in Southern Florida. *Plant Disease*. 65: 837-841.
- Carpane P., Laguna I. G., Virla E., Paradell S., Murúa L. and Giménez Pecci M. P. 2006. Experimental transmission of corn stunt Spiroplasma present in different regions of Argentina. *Maydica*. 51: 461-468.
- Davis R. E., Worley J. F., Whitcomb R. F., Ishijima T. and Steere R. L. 1972. Helical filaments produced by a mycoplasma-like organism associated with corn stunt disease. *Science, New Series*. 176 (4034): 521-523.
- Doyle J. and Doyle M. 1994. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Fletcher J., Melcher U. and Wayadande A. 2006. The phytopathogenic Spiroplasmas. *Prokaryotes*. 4: 905-947.
- Fletcher J., Wayadande A., Melcher U. and Ye F. 1998. The Phytopathogenic Mollicute-Insect Vector Interface: A Closer Look. *Phytopathology*. 88 (12): 1351-1358.
- Giménez Pecci M. P., Laguna I. G., Avila A. O., Remes Lenicov A. M., Virla E., Borgogno C., Nome C. y Paradell S. 2002a. Difusión del Corn Stunt Spiroplasma del Maíz (*Spiroplasma kunkelii*) y del vector (*Dalbulus maidis*) en la Republica Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*. 105(1): 1-8.

- Giménez Pecci M. P., Carpane P. D., Nome C. F., Paradell S., Remes Lenicov A.M., Virla E., y Laguna I. G. 2003. Presencia del Corn stunt spiroplasma y su vector *Dalbulus maidis* en el noroeste Argentino. XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatología. Brazilian Phytopathology Society. 28: S253.
- Giménez Pecci M. P., Carpane P. Carloni E., Nome C., Fiorona M. y Laguna I. G. 2009. Técnicas empleadas en la identificación y caracterización de *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb *et. al.* 1986 (reino Eubacteria, clase Mollicutes). En: Procedimientos empleados en la identificación de organismos fitopatógenos. Laguna I. G., Conci V., Rodriguez Pardina P., Truol G., Fiorona M. y Difeo L. (ed.). Biglia, Argentina, pp. 53-65.
- Kitajima, E. W. 1997. Curso: "Microscopia electrónica de virus de plantas". Centro de Microscopía Electrónica de apoyo a la investigación agropecuaria. Escuela Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidad de Sao Paulo. Brasil. Texto completo
- Kwon M., Wayadande A. and Fletcher J. 1999. *Spiroplasma citri* movement into the intestines and salivary glands of its leafhopper vector, *Circulifer tenellus*. Phytopathology. 89: 1144-1151.
- Lopes J. R. S. y Oliveira C. M. 2004. Vectores de vírus e mollicutes em milho. En: Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vectores e mancha por *Phaeosphaeria*. Lopes J. R. S. y Oliveira C. M (ed). Brasilia, DF, pp. 35-60.
- Madden L. V. and Nault L. R. 1983. Differential Pathogenicity of Corn Stunt Mollicutes to Leafhopper Vectors in *Dalbulus* and *Baldulus* species. Phytopathology 73: 1608-1614.
- Markham P. 1983. Spiroplasmas in leafhoppers: a review. The Yale journal of biology and medicine. 56: 745-751.
- Markham P., Townsend R., Paskitt K. and Saglio P. 1977. Transmission of corn stunt to dicotyledonous plants. Plant Disease Reporter. 61: 342-345.
- Maunsbach, A. B. 1998. Immunolabeling and Staining of Ultrathin Sections in Biological Electron Microscopy. En: Cell Biology: A Laboratory Handbook. 2º Edition. Vol 3. Academic Press. 268-276.
- Massola Júnior N. S., Bedendo I. P., Amorim L. e Lopes J. R. S. 1999. Effects of the inoculation time on corn with *Spiroplasma kunkelii* on yield components. Fitopatologia Brasileira 24(4): 571-573.
- Nault L. and DeLong D. 1980. Evidence for Co-evolution of leafhoppers in the genus *Dalbulus* (Cicadellidae: Homoptera) with maize and its ancestors. Annals of the Entomological Society of America. 73:349-353.
- Nault L. R., Gingery R. E. and Gordon D.T. 1980. Leafhopper transmission and host range of *maize rayado fino virus*. Phytopathology. 70: 709-12.
- Nault L. R. 1980. Maize Bushy Stunt and Corn Stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. Phytopathology. 70: 659-662.
- Nault L. R., Madden L. V., Styer W. E., Triplehorn B. W., Shambaugh G. H. and Heady S. E. 1984. Pathogenicity of corn stunt spiroplasma and maize bushy stunt mycoplasma to their vector, *Dalbulus longulus*. Phytopathology. 74: 977-979.

- Nome C., Magalhães P. C., Oliveira E., Nome S. and Laguna I. G. 2009. Differences in intracellular localization of corn stunt spiroplasmas in magnesium treated maize. *Biocell*. 33 (2): 1-4.
- Oliveira C. M., Lopes J. R. S., Dias C. T. S. and Nault L. R. 2004. Influence of latitude and elevation on polymorphism among populations of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Brazil. *Environmental Entomology*. 33: 1192-1199.
- Özbek E., Miller S., Meulia T. and Hogenhout S. 2003. Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. *Journal of invertebrate pathology*. 82: 167-175.
- Paradell S. 1995. Especies argentinas de Homópteros Cicadélidos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*. 71: 213-234.
- Paradell S. L., Virla E. G. and Toledo A. 2001. Leafhoppers species richness and abundance on corn crops in Argentina (Insecta-Hemiptera-Cicadellidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. Madrid*. 27: 465-474.
- Paradell S., Virla E., Remes Lenicov A.M., Giménez Pecci M. P., Catalano M. I. Laguna I. G. e Murúa L. 2005. Cicadélidos sobre cultivos de maíz y la maleza asociada em áreas afectadas por Corn Stunt Spiroplasma (CSS) de las provincias de la zona centro de Argentina (Hemíptera-Auchenorrhyncha). VIII Congreso Nacional de Maíz. Rosario. Argentina. 296-299.
- Pitre H. 1967. Greenhouse studies of the host range of *Dalbulus maidis*, a vector of the corn stunt virus. *Journal of economic entomology*. 60: 417-421
- Remes Lenicov A. M. M., Paradell S. y Catalano M. I. 2006. Hemípteros auquenorrincos asociados al cultivo de sorgo en la Argentina (Insecta-Hemiptera). *Revista de Investigaciones Agronómicas* 35 (002): 3-20.
- Triplehorn B. W. and Nault L. R. 1985. Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the Macrostelini. *Annals of the Entomological Society of America*. 78: 291-315.
- Virla, E. 1990a. Biología de los Homópteros Argentinos I. Datos bionómicos preliminares de *Exitianus obscurinervis* (Stal, 1859) (Insecta-Cicadellidae). *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral*. 21 (2): 129-137.
- Virla, E. 1990b. Observaciones preliminares acerca de los hospedantes preferenciales de *Exitianus obscurionervis* (Stal, 1859) (Insecta-Cicadellidae). *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral*. 21 (2): 139-145.
- Virla E., Remes Lenicov A. M. M. y Paradell S. 1991. Presencia de *Dalbulus maidis* (Insecta, Homoptera, Cicadellidae) sobre maíz y teosinte en la Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*. 67: 23-30.
- Virla E. 2000. Aportes al conocimiento del complejo de enemigos naturales de *Exitianus obscurinervis* (Insecta- Cicadellidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*. 26: 365-375.

- Virla E. G., Paradell S. L. y Diaz P. A. 2003. Estudios bioecológicos sobre la chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (Insecta-Cicadellidae) en Tucumán (Argentina). Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. Madrid. 29: 17-25.
- Wayadande A. C. and Fletcher J. 1995. Transmission of *Spiroplasma citri* lines and their ability to cross gut and salivary gland barriers within the leafhopper vector *Circulifer tenellus*. Phytopathology. 85: 1256-1259.
- Whitcomb R. F., Chen T. A., Williamson D. L., Liao C., Tully J. G., Bové J. M., Mouches C., Rose D. L., Coan M. E. and Clark T. 1986. *Spiroplasma kunkelii* sp. nov.: Characterization of the etiological agent of corn stunt disease. International Journal of Systematic Bacteriology. 36(2): 170-178.

CAPÍTULO 4

VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA TASA PORCENTUAL DE *Dalbulus maidis* PORTADORES E INFECTIVOS DE *Spiroplasma kunkelii* EN UNA POBLACIÓN DE TUCUMÁN

INTRODUCCIÓN

La chicharrita del maíz, *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) es una plaga importante del maíz (*Zea mays* L.) en América debido a que es la principal especie vectora del mollicute *Spiroplasma kunkelii* (Madden y Nault, 1983; Whitcomb *et al.*, 1986), uno de los agentes causales del achaparramiento del maíz. En el norte argentino, *S. kunkelii* y su vector *D. maidis* se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes regiones agroecológicas (Paradell *et al.*, 2001; Giménez Pecci *et al.*, 2002a). La incidencia de la enfermedad puede llegar al 100% en algunos lotes, y en plantas severamente afectadas la producción puede ser nula (Giménez Pecci *et al.*, 2002b; Virla *et al.*, 2004). Los géneros *Dalbulus* sp. y *Zea* sp. son usualmente reconocidos como los únicos hospedantes naturales de *S. kunkelii* y, a pesar de la importancia de la enfermedad, poco se sabe donde inverna el patógeno cuando no se encuentra el cultivo.

Los insectos vectores son los encargados de albergar y/o dispersar *S. kunkelii* desde una planta enferma a plantas de maíz sanas (Fletcher *et al.*, 2006). El género *Dalbulus* pertenece a la familia Cicadellidae y presenta la mayor cantidad de especies vectoras de *S. kunkelii* (Nault, 1990): *D. maidis*, *D. elimatus*, *D. gelbus*, *D. guevarai*, *D. quinquenotatus*, *D. tripsacoides* y *D. longulus* (Madden y Nault 1983; Nault *et al.*, 1984). Sin embargo, por su alta eficiencia de transmisión y su amplia distribución, *D. maidis* es considerada la principal especie

vectora del patógeno (Madden y Nault 1983; Nault, 1990; Oliveira *et al.*, 2004). Adicionalmente, *D. maidis* es la única especie del género que está presente en Argentina (Virla *et al.*, 1991; Paradell, 1995) y se la encuentra regularmente al norte del paralelo de 30 °LS, por lo que se considera que está habitualmente en el área subtropical del país (Paradell *et al.*, 2001).

Dalbulus maidis se alimenta solamente de maíz y teosinte (Nault, 1980; Nault y Madden, 1985; Larsen *et al.*, 1992). En nuestro país, a pesar de que se observó el insecto en teosinte (Virla *et al.*, 1991), esta especie vegetal carece de importancia epidemiológica porque su distribución geográfica es muy baja, limitada solamente a algunas parcelas experimentales. Es por eso que se considera al maíz como el único hospedante vegetal del vector *D. maidis*, y por ende del mollicute *S. kunkelii*. Debido a que *D. maidis* sólo se alimenta de plantas cultivadas anuales, la pérdida de su hospedante representa un serio obstáculo dentro de su ciclo de vida. Varios trabajos han sido realizados para esclarecer como sobreviven el periodo invernal *D. maidis* y el espiroplasma que transmite al perder su principal fuente de alimento (Larsen *et al.*, 1992; Virla *et al.*, 2003; Summers *et al.*, 2004; Moya-Raygoza *et al.*, 2007a; 2007b).

Estudios realizados en laboratorio demostraron que los adultos de *D. maidis* criados en condiciones climáticas que simulan la estación seca mexicana (invierno) pueden sobrevivir con tan solo agua durante dos meses (Larsen *et al.*, 1992). Esto sugiere que las chicharritas pasan el invierno únicamente como adulto, invernando en lugares protegidos en las regiones más elevadas de México (Larsen *et al.*, 1993). Por otro lado, se ha visto que la sobrevivencia de *D. maidis* no es afectada por la presencia de *S. kunkelii* (Madden y Nault, 1983; Moya-Raygoza *et al.*, 2007b), sino que eventualmente la presencia del patógeno dentro del insecto beneficiaría su supervivencia (Ebbert y Nault, 2001), pudiendo contribuir a que *D. maidis* pueda sobrevivir durante el invierno (Ebbert y Nault, 1994).

En nuestro país, *D. maidis* y *S. kunkelii* han sido detectados en varias provincias del norte argentino cuando el maíz se encuentra en la etapa de crecimiento (Giménez Pecci *et al.*, 2002b; 2003). En la provincia de Tucumán (Argentina), *D. maidis* y *S. kunkelii* reaparecen todos los años en el maizal luego del período invernal en ausencia de plantas de maíz (Virla *et al.*, 2003, Giménez Pecci *et al.*, 2002b). *Dalbulus maidis* sobrevive el invierno como adulto y coloniza los cultivos de maíz durante la primavera siguiente (Virla *et al.*, 2003). Sin embargo, se desconoce la tasa porcentual de individuos portadores e infectivos de *S. kunkelii* que serán inóculo inicial en la campaña agrícola que comienza, factor fundamental en el desarrollo de una epidemia.

En este capítulo se plantea como objetivo conocer el porcentaje de *D. maidis* portadores e infectivos de *S. kunkelii* en la provincia de Tucumán, para determinar la capacidad de la población del vector para albergar *S. kunkelii* en distintas estaciones del año.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Muestreo de insectos

Se realizaron 17 muestreos de *D. maidis* entre agosto de 2004 y enero de 2007 en la localidad de El Manantial, provincia de Tucumán, abarcando tres campañas agrícolas (2004/05, 2005/06 y 2006/07). Los muestreos se realizaron en cultivos de maíz cuando éstos estaban presentes, y en los rastrojos o vegetación silvestre circundante a dichos lotes cuando el cultivo no estaba presente.

La localidad de El Manantial, está ubicada a 495 m.s.n.m. a los 26° 49' 50,2" latitud sur y 65° 16' 59,4" longitud oeste. Presenta un clima netamente tropical, con un período de sequía entre los meses de mayo a septiembre. La temperatura media anual de los meses más cálidos es de 24,7 °C (enero) y de 11,6 °C en los meses mas fríos (julio). La fecha probable de la primera helada el 15 de

mayo y la última es el 30 de agosto. La precipitación media anual histórica es de 1050 mm y el 84% ocurre entre noviembre y marzo. En esta localidad, el cultivo de maíz se siembra a partir de las primeras lluvias de primavera - verano, las que a veces permiten tener siembras tempranas (noviembre - diciembre) y/o siembras tardías (enero - febrero) (Diaz *et al.*, 2005; Albarracin *et al.*, 2008).

La recolección de insectos se realizó utilizando una red entomológica de arrastre (Virla *et al.*, 2003). En todos los muestreos, los insectos fueron identificados y colocados en jaulas plásticas de polietileno conteniendo papel absorbente humedecido y hojas de maíz. El procedimiento permitió el transporte de las chicharritas vivas al Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) en la provincia de Córdoba, Argentina. En laboratorio, los insectos fueron sexados para utilizarlos en los ensayos de transmisión.

4.2.- Porcentaje de insectos infectivos de *S. kunkelii*

Se realizaron ensayos de inoculación para determinar el porcentaje de *D. maidis* que transmiten *S. kunkelii* a plantas sanas de maíz. Cada insecto fue puesto individualmente en contacto con una planta de maíz sana (cv. Pop Zélia) en el estado de 1 hoja dentro de un cilindro plástico (2 lbs.) de polietileno con aberturas recubiertas con tela de voile. Las transmisiones se realizaron en invernadero (24-27 °C, fotoperíodo 16 horas de luz natural suplementada con luz artificial y 8 hs. de oscuridad). Los insectos se mantuvieron en contacto con las plántulas durante un período de acceso a la inoculación de 7 días (PAI) (Nault, 1980).

Las plantas se mantuvieron en el invernadero y fueron asperjadas periódicamente con insecticida para eliminar las ninfas eclosionadas de oviposiciones realizadas durante el PAI. Los maíces fueron evaluados semanalmente para detectar la presencia de síntomas del achaparramiento causado por *S. kunkelii* (Nault, 1980). Todas las plantas utilizadas en los ensayos de transmisión se analizaron mediante la técnica DAS-ELISA para detectar *S. kunkelii* como se describió anteriormente (Capítulo 2). La proporción de insectos

infectivos se determinó como el cociente entre el número de plantas de maíz positivas en relación al número total de plantas utilizadas en los ensayos de transmisión.

4.3.- Porcentaje de insectos portadores de *S. kunkelii*

Luego del PAI, los insectos sobrevivientes de los ensayos de transmisión se analizaron individualmente para detectar *S. kunkelii* mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los insectos se recuperaron con un aspirador bucal, se colocaron individualmente en microtubos de 1,5 ml y almacenaron a – 20 °C para determinar la presencia *S. kunkelii* mediante (PCR) (Capítulo 3). Se incluyeron como controles ADN extraído de un ejemplar de *D. maidis* que en ensayos previos transmitió *S. kunkelii* a plantas sanas de maíz y ADN de adultos de *D. maidis* de colonias sanas obtenidas como se describe anteriormente (Capítulo 3). La proporción de insectos portadores se determinó como el cociente entre el número de insectos con reacción de PCR positiva para *S. kunkelii* en relación al número total de insectos utilizados de cada muestreo.

4.4.- Análisis estadístico

Los insectos colectados en cada muestreo se agruparon por estación de la siguiente manera: junio, julio y agosto (invierno); septiembre, octubre y noviembre (primavera); diciembre, enero y febrero (verano), marzo, abril y mayo (otoño). El porcentaje de insectos portadores y transmisores de *S. kunkelii* se relacionó con la estación del año y con el sexo a través de tablas de contingencia utilizando el software estadístico InfoStat (InfoStat, 2007).

RESULTADOS

4.1.- Muestreo de insectos

Se recolectaron 1.227 insectos en 17 muestreos. Del total de insectos colectados, 1048 fueron sexados, de los cuales 631 (60%) fueron hembras y 417 (40%) machos (Fig. 4.1). Fueron descartados del análisis estadístico aquellos insectos y las transmisiones correspondientes, donde no se encontró el insecto o estaba muerto luego del PAI, quedando un total de 955 insectos.

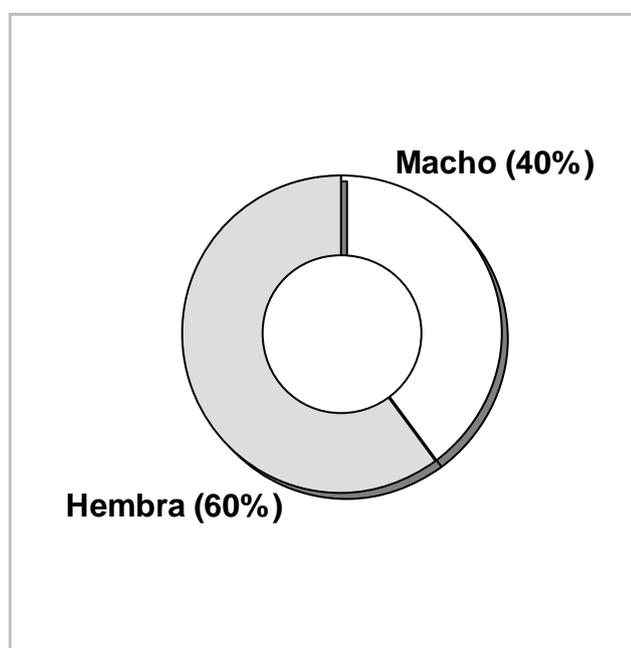


Fig. 4.1. Proporción de sexos en adultos de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) colectados en la localidad El Manantial, Tucumán, entre agosto del 2004 y enero de 2007.

El análisis por estación y sexo permitió señalar que la cantidad de hembras y machos dependió de la estación en la que se realizó el muestreo ($p = 0,0035$), siendo en todas las estaciones mayor la cantidad de hembras que de machos, y el verano la estación con mayor cantidad de insectos.

4.2.- Porcentaje de insectos infectivos de *S. kunkelii*

Durante los muestreos realizados en los primeros cuatro meses de la campaña agrícola 2004/05 (septiembre, noviembre, diciembre y enero) no se realizaron ensayos de transmisión y los insectos fueron evaluados solamente para determinar el porcentaje de *D. maidis* portadores de *S. kunkelii*.

Se analizaron 616 plantas por serología (Tabla 4.1) y debido a la muerte prematura de algunos maíces, 29 plantas utilizadas en los ensayos de transmisión no pudieron ser analizadas mediante DAS-ELISA. Todos los insectos utilizados en estas inoculaciones se analizaron individualmente mediante PCR. Las chicharritas utilizadas en la inoculaciones de estas plantas fueron 641, de las cuales 407 (63,49%) fueron hembras y 234 (36,51%) machos. Mediante el análisis de PCR se confirmó que del total de *D. maidis* utilizados 628 (97,97 %) fueron negativas y 13 (2,03%) con reacción positiva para *S. kunkelii*. De los insectos positivos 9 (69,23%) fueron hembras y 4 (30,77%) machos. El porcentaje de insectos transmisores fue de 0,70%, porque solamente 4 plantas dieron reacción positiva a *S. kunkelii* del total de plantas analizadas. De los 4 insectos transmisores (30,77%), 2 fueron hembras y 2 fueron machos. En 1 planta inoculada con un insecto positivo no se pudo determinar el resultado de la transmisión. No se detectó asociación significativa entre el sexo del insecto y el resultado de la transmisión ($p = 0,6336$). La proporción de hembras y de machos infectivos fue igual en las plantas positivas.

Tabla 4.1. *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) analizados para determinar el número de insectos portadores (PCR) e infectivos (DAS-ELISA) de *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) durante 4 estaciones del año de una población de insectos de El Manantial, Tucumán.

Estación	<i>D. maidis</i>			Plantas de maíz		
	Insectos portadores (PCR)			Insectos transmisores (DAS - ELISA)		
	Analizados	Positivos	(%)	Analizadas	Positivas	(%)
Invierno	146	0	0	70	0	0
Primavera	250	2	0,8	123	0	0
Verano	287	9	3,14	160	3	1,88
Otoño	272	6	2,21	263	1	0,38
Total	955	17	1,78	616	4	0,70

4.3.- Porcentaje de insectos portadores de *S. kunkelii*

Fueron analizados 955 insectos mediante la técnica PCR, de los cuales 581 fueron hembras y 374 machos, representando el 60,84% y 39,16% respectivamente. El detalle del número de insectos utilizados para determinar el porcentaje de insectos portadores con *S. kunkelii* por estación y sexo se encuentra en las figuras 4.2 y 4.3.

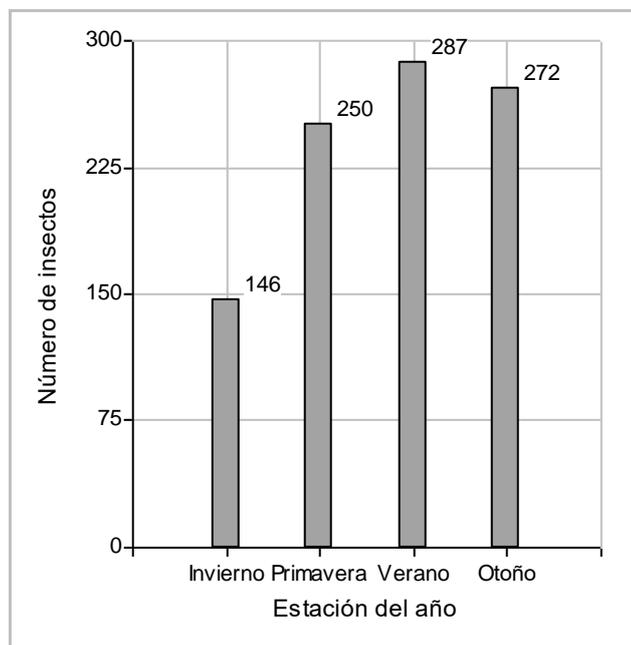


Fig. 4.2. *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) analizados mediante PCR para determinar la presencia de *S. kunkelii* (Whitcomb) entre agosto de 2004 y enero de 2007 en El Manantial, Tucumán.

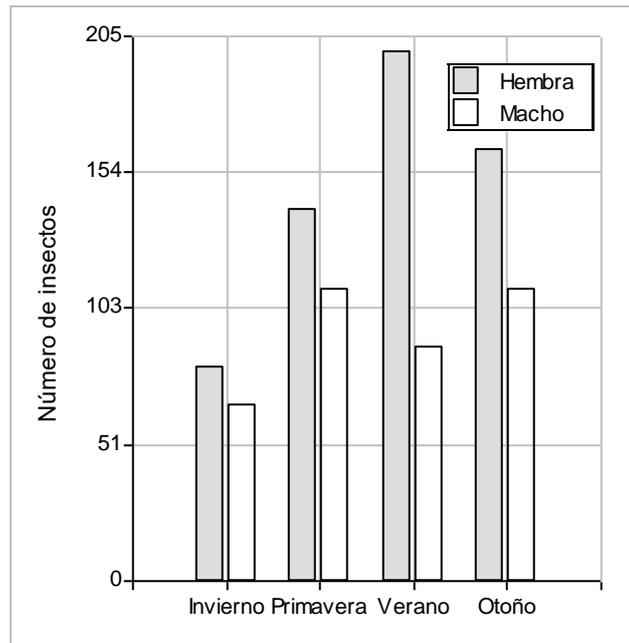


Fig. 4.3. Adultos machos y hembras de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) analizados mediante la técnica PCR para determinar la presencia de *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) entre agosto de 2004 y enero de 2007 en El Manantial, Tucumán.

Esta metodología de trabajo permitió confirmar la presencia de *S. kunkelii* en los insectos que transmitieron el patógeno en los ensayos de transmisión. En la figura 4.4 se puede observar, a modo de ejemplo, la reacción positiva de PCR que confirma la presencia de *S. kunkelii* en algunos insectos (calles 12, 17 y 19) en gel de agarosa utilizado para correr el producto de PCR del muestreo de verano.

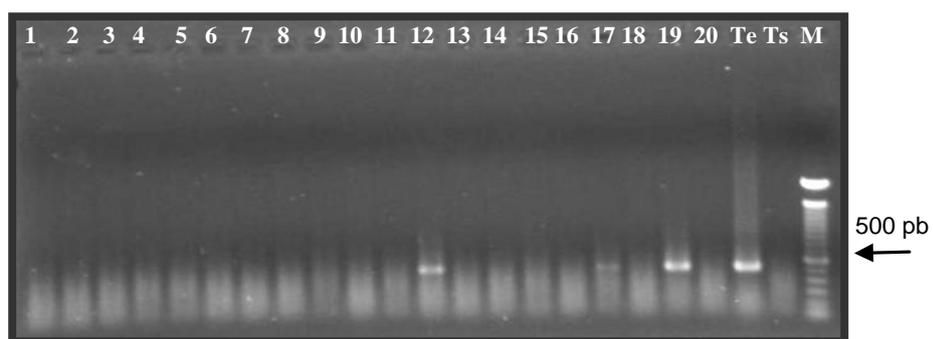


Fig. 4.4. Gel de agarosa (1,4% p/v) donde se muestra la banda del producto de amplificación de PCR (500 pb) obtenida con iniciadores específicos para *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb). Calle 1-20. ADN de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) colectado a campo de la provincia de Tucumán. Ts. Control sano. Te. Control enfermo. M. Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Promega Corp.)

Estos estudios permitieron comprobar la presencia de *S. kunkelii* en *D. maidis* colectados sobre maíz durante primavera, verano y otoño. No se detectó la presencia del patógeno en *D. maidis* durante la estación invernal (Fig. 4.5).

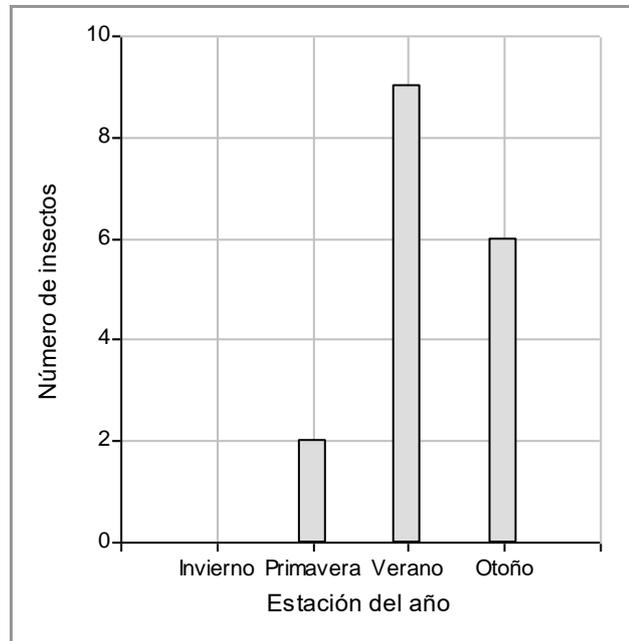


Fig. 4.5. *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott) portadores de *Spiroplasma kunkelii* (Whitcomb) colectados durante agosto de 2004 y enero de 2007 en El Manantial, Tucumán.

En la tabla 4.1 se observa el número de insectos portadores con *S. kunkelii* en las cuatro estaciones y se detallan los porcentajes que representan estos valores analizados. Del total de las 955 chicharritas analizadas mediante la técnica PCR, 17 (1,78%) fueron portadoras de *S. kunkelii*. En el estudio de la asociación entre la condición de *D. maidis* como portador y la estación del año de los insectos no se detectó asociación significativa entre las estaciones analizadas y la condición de *D. maidis* portador de *S. kunkelii* ($p = 0,0852$).

En los insectos portadores, 13 chicharritas fueron hembras (76,47%) y 4 (23,53%) fueron machos. No se detectó asociación significativa ($p = 0,1827$) entre el sexo del insecto y la condición de portador de *S. kunkelii*, es decir que la proporción de insectos portadores fue similar en ambos sexos.

DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la fluctuación temporal de *S. kunkelii* en poblaciones de *D. maidis* en la localidad El Manantial, Tucumán, un área subtropical donde se cultiva el maíz solamente en el periodo primavera - estival. Se encontró que el principal vector de *S. kunkelii* sobrevive el invierno como adulto en la zona de estudio, de acuerdo a lo mencionado anteriormente (Virla *et al.*, 2003). La proporción de sexos en el campo favorece a las hembras. Resultados similares fueron reportados por Virla *et al.* (2003), quienes encontraron mayor proporción de hembras durante un ciclo del cultivo.

Los resultados demuestran que la mayor cantidad de *D. maidis* se encuentra durante los meses de verano, al igual que lo observado por Virla *et al.* (2003). Esto se explica ya que *D. maidis* es una especialista del maíz y utiliza a esta especie para alimentarse y reproducirse (Nault y Madden, 1985). Además, está dotada de un elevado tiempo de desarrollo (huevo a adulto) y es una de las especies más fecundas del género en maíz (Nault y Madden, 1985). Pueden las hembras oviponer hasta 480 huevos (Remes Lenicov *et al.*, 1993) y en Tucumán *D. maidis* tiene cinco generaciones que se desarrollan entre noviembre y mayo (Virla *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando el maíz comienza a secarse, en los meses de otoño las poblaciones disminuyen y se preparan para invernar como adulto en lugares protegidos (Virla *et al.*, 2003).

Cuando se analizaron mediante PCR los insectos utilizados, se registró que algunos insectos no transmitieron *S. kunkelii* a pesar de ser portadores del patógeno, al igual que lo encontrado anteriormente por otros investigadores (Ebbert *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002). En este estudio, con *D. maidis* colectados en la localidad El Manantial, Tucumán, el 30,77% de los insectos portadores con *S. kunkelii* fueron inoculativos, lo que concuerda con lo encontrado en poblaciones de Poza Rica y Tlaltizapan, en México, donde el porcentaje de transmisión por *D. maidis* portadores de *S. kunkelii* fue del $30 \pm 14\%$ y $44.4 \pm 17\%$, respectivamente (Ebbert *et al.*, 2001). Esto puede deberse a

que el resto de los insectos puede haber adquirido *S. kunkelii* poco antes de su recolección, sin dar tiempo a que el patógeno colonice los tejidos de *D. maidis* y llegue a las glándulas salivales, momento a partir del cual el insecto es inoculativo. De hecho, después que *D. maidis* se alimenta de una planta enferma, el patógeno necesita un periodo de 19 ± 2 días de latencia en el insecto para poder ser transmitido (Nault, 1980), siendo que en el presente trabajo el período de acceso a inoculación fue de solamente 7 días. De este modo, mediante PCR se detecta *S. kunkelii* en el cuerpo de *D. maidis* durante el período de latencia, antes de que este patógeno alcance las glándulas salivales y convierta al insecto en inoculativo.

El porcentaje de insectos portadores con *S. kunkelii* varió del 0% en invierno al 3,14% en verano, con un promedio de 1,78% en las cuatro estaciones, siendo similar a lo mencionado por otros autores (Ebbert *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002; Moya-Raygoza *et al.*, 2007b). En el presente trabajo, el porcentaje de insectos portadores representa el promedio de los meses que se realizaron colectas de insectos en las diferentes estaciones del año y, si se analiza un mes en particular, el porcentaje máximo de insectos con *S. kunkelii* alcanza el 6,36% (enero de 2007). Sin embargo en Brasil, la probabilidad de encontrar *D. maidis* portadores con *S. kunkelii* varía del 2 al 20% (Oliveira *et al.*, 2002). Es posible que el número máximo de *D. maidis* portadores de *S. kunkelii* en la provincia de Tucumán sea menor al observado en sus congéneres colectados en otras áreas de América. Esto puede deberse, entre otros motivos, a un porcentaje mayor de *S. kunkelii* en Brasil en comparación a Argentina, lo que incrementaría la posibilidad de que los insectos adquieran el espiroplasma.

En el presente estudio no se encontraron *D. maidis* portadores de *S. kunkelii* en los insectos colectados en invierno. En base a los estudios de Summers *et al.*, (2004) y al comportamiento de *D. maidis* en laboratorio reportado por Ebbert y Nault (1994, 2001) y por Larsen *et al.* (1992), se esperaba encontrar insectos con *S. kunkelii* durante dicha estación. La no detección de insectos portadores puede ser debida al bajo número de insectos recolectados durante el

invierno (146 individuos) en relación al bajo porcentaje de insectos portadores (1,78%) del total analizado para las 4 estaciones.

Sin embargo, en primavera pudo detectarse la presencia de *S. kunkelii* (0,80%), sugiriendo que el patógeno sobrevivió en *D. maidis* durante el invierno. Esta suposición se basa en que después que *D. maidis* adquiere el patógeno de una planta enferma, tiene un periodo de incubación de *S. kunkelii* de aproximadamente 19 ± 2 días a 27 ± 2 °C, después de los cual puede transmitirlo (Nault, 1980). En plantas de maíz, los síntomas causados por *S. kunkelii* aparecen luego de un periodo de latencia de 43 ± 4 días a 27 °C (Nault, 1980). En Tucumán, las siembras de estación del cultivo se realizan generalmente entre la última semana de noviembre y la primera de diciembre (Díaz *et al.*, 2005; Albarracín *et al.*, 2008), en la que la temperatura promedio es alrededor de 25 °C. Teniendo en cuenta los tiempos de latencia requeridos en el insecto y en la planta, es poco probable que las chicharritas infectivas en la colecta de primavera hayan adquirido *S. kunkelii* de plantas enfermas en la misma primavera, sino es más probable que lo hayan adquirido durante el otoño anterior y sobrevivieron durante el invierno.

D. maidis es el vector más eficiente de *S. kunkelii* (Nault *et al.*, 1984) y ha sido utilizada experimentalmente en varios trabajos, para conocer aspectos epidemiológicos relacionados al manejo de la enfermedad: hospedantes (Nault, 1980), susceptibilidad de híbridos (Massola Júnior *et al.*, 1999a), medidas de control (Oliveira *et al.*, 2007), efectos del tiempo de inoculación y pérdidas ocasionadas por la enfermedad (Hruska y Gomez Peralta, 1997; Massola Júnior *et al.*, 1999b), trabajos en lo que fueron utilizados insectos de ambos sexos. En el presente estudio, en una población de la provincia de Tucumán, no se encontró una asociación significativa en la condición sexo (macho – hembra) y la capacidad de ser portador o inoculativos de *S. kunkelii*. Por tal motivo, se infiere que tanto hembras como machos de *D. maidis* juegan el mismo rol como diseminadores de *S. kunkelii* a campo.

CONCLUSIÓN

Dalbulus maidis se encuentra presente durante todo el año en áreas subtropicales, incluso cuando el cultivo de maíz no está implantado, debido a que el vector inverna en la vegetación espontánea.

El 0,70% de la población de *D. maidis* es inoculativo de *S. kunkelii* no siendo significativo el sexo y la estación de recolección.

El 1,78% de la población de *D. maidis* es portador de *S. kunkelii*, y el 30,77% de los insectos portadores son inoculativos, no siendo significativo la condición de hembras y machos ni la estación de recolección.

Las hembras y los machos de *D. maidis* se encuentran con proporciones similares de insectos portadores e inoculativos, lo que sugiere que ambos sexos tienen roles similares en la transmisión y diseminación de *S. kunkelii*.

BIBLIOGRAFÍA

- Albarracin E. L., Paradell S. and Virla E. G. 2008. Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha) associated with maize crops in northwestern Argentina, influence of the sowing date and phenology of their abundance and diversity. *Maydica*. 53(3-4): 289-296.
- Díaz C., Virla E., Carloni E., Giménez Pecci M. P. y Laguna I. G. 2005. Evaluación preliminar del efecto de la fecha de siembra sobre la incidencia del “Corn Stunt Spiroplasma” (CSS). VIII Congreso Nacional de Maíz. Rosario. Argentina. 277-280.
- Ebbert M. A. and Nault L. R. 1994. Improved overwintering ability in *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) vectors infected with *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae). *Environmental Entomology*. 23 (3): 634-644.
- Ebbert M. A. and Nault L. R. 2001. Survival in *Dalbulus* leafhopper vectors improves after exposure to maize stunting pathogens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 100: 311-324.
- Ebbert M. A., Jeffers D. P., Harrison N. A. and Nault L. R. 2001. Lack of specificity in the interaction between two maize stunting pathogens and field collected *Dalbulus* leafhoppers. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 101: 49-57.
- Fletcher J., Melcher U. and Wayadande A. 2006. The phytopathogenic spiroplasmas. *Prokaryotes*. 4: 905-947.
- Giménez Pecci M. P., Laguna I. G., Avila A. O., Remes Lenicov A.M., Virla E., Borgogno C., Nome C. y Paradell S. 2002a. Difusión del Corn Stunt Spiroplasma del Maíz (*Spiroplasma kunkelii*) y del vector (*Dalbulus maidis*) en la Republica Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata* 105 (1): 1-8.
- Giménez Pecci M. P., Oliveira E., Resende R. O., Laguna I. G., Conci L. R., Avila A., Herrera P., Galdeano E., Virla E. y Nome C. 2002b. Ocorrência de doenças causadas por mollicutes e por vírus em milho nas províncias de Tucumán e de Córdoba na Argentina. *Fitopatologia Brasileira*. 27: 403-407.
- Giménez Pecci M. P., Carpane P. D., Nome C. F., Paradell S., Remes Lenicov A.M., Virla E., y Laguna I. G. 2003. Presencia del Corn stunt spiroplasma y su vector *Dalbulus maidis* en el noroeste Argentino. XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatología. Brazilian Phytopathology Society. 28: S253.
- Hruska A. J. and Gomez Peralta M. 1997. Maize Response to Corn Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) Infestation and Achaparramiento Disease. *Journal of Economic Entomology*. 90(2): 604-610.
- InfoStat. 2007. Infostat/Profesional. Grupo Infostat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
- Larsen K. J., Nault L. R. and Moya-Ragoza G. 1992. Overwintering biology of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae): adult populations and drought hardiness. *Environmental entomology*. 21: 566-577.

- Larsen K. J., Lee R. E. and Nault L. R. 1993. Influence of developmental conditions on cold-hardiness of adult *Dalbulus leafhoppers*: implications for overwintering. *Entomologia experimentalis et applicata*. 67: 99-108.
- Madden L. V. and Nault L. R. 1983. Differential Pathogenicity of Corn Stunt Mollicutes to Leafhopper Vectors in *Dalbulus* and *Balbulus* species. *Phytopathology* 73: 1608-1614.
- Massola Júnior N. S., Bedendo I. P., Amorim L. e Lopes J. R. S. 1999a. Fitoplasma e espiroplasma em milho: multiplicação e efeito na produção de genótipos resistente e suscetível. *Summa Phytopathologica*. 25: 356-359.
- Massola Júnior N. S., Bedendo I. P., Amorim L. e Lopes J. R. S. 1999b. Effects of the inoculation time on corn with *Spiroplasma kunkelii* on yield components. *Fitopatologia Brasileira* 24(4):571-573.
- Moya-Raygoza G., Hogenhout S. A., and Nault L. R. 2007a. Habitat of the Corn leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) during the dry (winter) season in Mexico. *Environmental entomology*. 36 (5): 1066-1072.
- Moya-Raygoza G., Palomera-Avalos V. and Galaviz-Mejia C. 2007b. Field overwintering biology of *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) and its vector *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Ann. Appl. Biol.* 151: 373-379.
- Nault L. R. 1980. Maize Bushy Stunt and Corn Stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. *Phytopathology*. 70: 659-662.
- Nault L. R., Madden L. V., Styer W. E., Triplehorn B. W., Shambaugh G. H. and Heady S. E. 1984. Pathogenicity of corn stunt spiroplasma and maize bushy stunt mycoplasma to their vector, *Dalbulus longulus*. *Phytopathology*. 74:977-979.
- Nault, L. and L. Madden. 1985. Ecological strategies of *Dalbulus* leafhoppers. *Ecological entomology*. 10:57-63.
- Nault L. R. 1990. Evolution of an insect pest: maize and the corn leafhopper, a case study. *Maydica*. 35: 165-175.
- Oliveira C. M., Molina R. M. S., Albres R. S. e Lopes J. R. S. 2002. Disseminação de mollicutes do milho a longas distâncias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Fitopatologia Brasileira*. 27: 91-95.
- Oliveira C. M., Lopes J. R. S., Dias C. T. S. and Nault L. R. 2004. Influence of latitude and elevation on polymorphism among populations of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Brazil. *Environmental Entomology*. 33: 1192-1199.
- Oliveira C. M., Oliveira E. Canuto M. e Cruz I. 2007. Controle químico da cigarrinha-do-milho e incidência dos enfezamentos causados por mollicutes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 42 (3): 297-303.
- Paradell S. 1995. Especies argentinas de Homópteros Cicadélidos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata)*. 71:213-234.
- Paradell S. L., Virla E. G. and Toledo A. 2001. Leafhoppers species richness and abundance on corn crops in Argentina (Insecta-Hemiptera-Cicadellidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. Madrid*. 27:465-474.

- Remes Lenicov A. M. M. y Virla E. 1993. Aportes al conocimiento de la biología de *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) en condiciones de laboratorio. *Neotrópica*. 39(1001-102): 103-109.
- Summers C. G., Newton A. S. and Opgenorth D. C. 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.
- Virla E., Remes Lenicov A. M. M. y Paradell S. 1991. Presencia de *Dalbulus maidis* (Insecta, Homoptera, Cicadellidae) sobre maíz y teosinte en la Argentina. *Revista de la facultad de Agronomía*. 67: 23-30.
- Virla E. G, Paradell S. L. y Diez P. A. 2003. Estudios bioecológicos sobre la chicharrita del maíz *Dalbulus maidis* (Insecta-Cicadellidae) en Tucumán (Argentina). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*. Madrid. 29:17-25.
- Virla E. G., Díaz C. G., Carpane P., Laguna I. G., Ramallo J., Gerónimo Gómez L. y Giménez Pecci M. P. 2004. Evaluación preliminar de la disminución en la producción de maíz causada por el “Corn Stunt Spiroplasma” (CSS) en Tucumán, Argentina. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*. 30: 403-413.
- Whitcomb R. F., Chen T. A., Williamson D. L., Liao C., Tully J. G., Bové J. M., Mouches C., Rose D. L., Coan M. E. and Clark T. 1986. *Spiroplasma kunkelii* sp. nov.: Characterization of the etiological agent of corn stunt disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36 (2): 170-178.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo se confirmó que la región agrícola central de Argentina presenta un ambiente adecuado para el desarrollo del achaparramiento del maíz causado por *S. kunkelii* durante el período estival. En esta región los valores de prevalencia más altos están en la provincia de Santa Fe y los niveles más altos de incidencia se encuentran en localidades ubicadas al norte de la región agrícola central, en la zona de transición del clima templado al subtropical entre los paralelos 30° y 31° de latitud sur. Los valores de incidencia de la enfermedad decrecen hacia el sur. Las localidades más australes donde se encontró el achaparramiento del maíz durante las campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07 fueron en Junín (34° LS) y Saladillo (35° LS), respectivamente.

Se determinó una amplia distribución de *D. maidis* en la zona agrícola central de Argentina y se confirmó su presencia en aquellas áreas donde se detectó el achaparramiento del maíz. Se determinó una mayor cantidad de individuos de *D. maidis* al norte del área estudiada, en el área de transición del clima templado al subtropical, junto a mayores niveles de incidencia de la enfermedad. La localidad más austral donde se encontró el vector fue en General Villegas (35° LS). La no detección del principal vector en algunos lotes afectados por el achaparramiento del maíz ubicadas en la provincia de Buenos Aires, podrían suponer la presencia de otra especie diferente a *D. maidis* como vector de *S. kunkelii*.

En condiciones experimentales se identificó un nuevo vector de *S. kunkelii*, al cicadélido *Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859). Es el segundo vector de *S. kunkelii* identificado en Argentina. El vector tiene una amplia distribución en el país y presenta un amplio rango de hospedantes de especies silvestres y cultivadas. Este hallazgo requiere profundizar el conocimiento sobre la especie,

indagando el rol de especies silvestres y cultivadas hospedantes del vector que podrían ser reservorios y fuentes de inóculo del patógeno. Por su amplia distribución, este insecto podría actuar como transmisor de *S. kunkelii* al cultivo de maíz en las zonas de menor temperatura de la región agrícola central del país, donde no se halla la principal especie vectora en lotes afectados por la enfermedad.

En áreas subtropicales *D. maidis* se encuentra presente durante todo el año, incluso cuando el cultivo de maíz no está implantado, debido a que el vector inverna como adulto en la vegetación espontánea. El porcentaje promedio de *D. maidis* portadores e inoculativos de *S. kunkelii* fue del 1.78% y 0.70% respectivamente. Las hembras y los machos de *D. maidis* se encuentran con proporciones similares de insectos infectivos, lo que indica que ambos sexos pueden tener roles similares en la transmisión y dispersión de *S. kunkelii*.

Este estudio sirve de base para futuras líneas de investigación, las cuales deberían estar orientadas a:

Determinar los daños económicos que ocasiona el achaparramiento del maíz en la zona de transición de clima templado al clima subtropical, debido que en los monitoreos realizados durante las dos campañas agrícolas 2005/06 y 2006/07 se identificó la enfermedad con incidencias de hasta un 29 %.

Evaluar el comportamiento de distintos cultivares de maíz de clima templado que se utilizan comercialmente, para determinar los germoplasmas más tolerantes para ser utilizados como una estrategia de manejo que minimice los daños económicos ocasionados por esta enfermedad.

Realizar estudios con el nuevo vector, *E. obscurinervis*, referidos a la posibilidad de la existencia de nuevos hospedantes alternativos que sirvan como fuentes de inóculo de *S. kunkelii*.

Continuar estudios de transmisión con otras especies de cicadélidos endémicos abundantes en maíz y gramíneas silvestres asociadas, incrementando el número de individuos analizados.