



Identification and abundance of six viruses and a spiroplasma in single and mixed infections in maize fields in Veracruz, Mexico.

Identificación y abundancia de seis virus y un espiroplasma en infecciones simples y mixtas en campos de maíz en Veracruz, México.

Aguilera, S.^{1,2}, Rodríguez-Escobar, J. G.³, Romero-González, V. N.¹,
Osorio-Acosta, F.⁴, López-Romero, G.⁴, Silva-Rosales, L.^{1*}

¹Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav).
Km. 9.6 Libramiento Norte. Carretera Irapuato-León. Irapuato, Guanajuato, México.

²Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos (LIIA), Instituto Tecnológico de Tepic, Tepic, Nayarit, México.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
C.E. Cotaxtla. Carretera federal Veracruz-Córdoba, México.

⁴Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus Veracruz, Carretera federal Xalapa-Veracruz, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Aguilera, S., Rodríguez-Escobar, J.G., Romero-González, V.N., Osorio-Acosta, F., López-Romero, G., Silva-Rosales, L. (2019). Identification and abundance of six viruses and a spiroplasma in single and mixed infections in maize fields in Veracruz, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 6, e419. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e419>



ABSTRACT

Plant viruses are important agricultural pathogens because they cause significant losses in economic crop yield and quality. They can occur in single or mixed infections interfering with plant development. Diseases caused by these viruses are found throughout the maize-growing regions of the world and can cause significant losses for producers. Additionally, the Corn stunt spiroplasma (CSS) is able to co-infect maize plants together with phytopathogen viruses, increasing losses in this crop. In this study, using DAS-ELISA tests, we detected *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV), *Maize stripe virus* (MSpV), *Brome mosaic virus* (BMV), *Maize white line mosaic virus* (MWLMV), and CSS in single and mixed infections in a survey made in the State of Veracruz. Up to four different viruses were identified in mixed infections with

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: December 18th 2017.

Accepted/Aceptado: April 18th 2018.

Availableonline/Fecha de publicación: March 21st 2019.

*Corresponding Author:

Laura, Silva Rosales. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato. México. Phone: +52(462) 623 9651. E-mail: laura.silvar@cinvestav.mx

RESUMEN

Los virus patógenos de plantas son importantes para la agricultura pues causan cuantiosas pérdidas económicas en el rendimiento y calidad de los cultivos. Estos pueden provocar infecciones simples o mixtas, interfiriendo con el desarrollo de las plantas. Las enfermedades ocasionadas por virus se encuentran a lo largo de zonas agrícolas de maíz en todo el mundo, y llegan a representar pérdidas significativas para los productores. Adicionalmente, el *Corn stunt spiroplasma* (CSS) es capaz de co-infectar plantas de maíz en conjunto con virus fitopatógenos, incrementando las pérdidas en este cultivo. En este estudio, con ensayos de DAS-ELISA, detectamos *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV), *Maize stripe virus* (MSpV), *Brome mosaic virus* (BMV), *Maize white line mosaic virus* (MWLMV), además del CSS, en infecciones simples y mixtas en el estado de Veracruz. Se identificaron más de cuatro virus distintos en infecciones mezcladas con el SCMV que fue el virus más frecuente, seguido por MDMV y CSS. Este es el primer reporte de infecciones simultáneas con más de dos virus, en plantas de maíz en México.

SCMV, the most prevalent virus; followed by MDMV and CSS. This is the first report of simultaneous infections with more than two viruses in maize plants in Mexico.

KEY WORDS

Maize viruses; maize spiroplasma; mixed infections; incidence.

Introduction

Maize crop (*Zea mays* L.) is the fourth most important crop around the world. In Mexico, approximately 70 % of the total production comes from eight states: Chiapas, Guerrero, Jalisco, Mexico, Michoacan, Puebla, Sinaloa and Veracruz (Juárez, 2013). Viruses are important agricultural pathogens causing significant economic losses on yield and quality reduction depending on the geographic region (Ali & Yan, 2012). They can occur in single or mixed infections affecting photosynthetic processes and, some of them, also interfere with plant development. The number of reports on mixed infections has increased. Although these increased reports present new problems, they are also providing valuable information for disease control strategies (Rentería *et al.*, 2011).

Maize dwarf mosaic virus (MDMV), transmitted by aphids, was the first virus reported to cause significant yield reduction on corn crops in the United States. This virus is a member of the *Potyvirus* genus and *Potyviridae* family, and remains among the most harmful viruses causing diseases of maize in various regions of the world, mostly in some Asian and European countries (Gell *et al.*, 2010). More recently, infections of *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) (genus *Machlomovirus*, family *Tombusviridae*), transmitted by thrips, have been important in some countries (Silva-Rosales *et al.*, 2015; Wangai *et al.*, 2012). Other viruses such as *Maize necrotic streak virus* (MNeSV), *Maize rayado fino virus* (MRFV) and *Maize fine streak virus* (MFSV) also cause corn diseases. In Central and South America, MRFV causes the “rayado fino” or “achaparramiento” of maize, one of the most known diseases in corn (Vasquez & Mora, 2007). In Mexico, several viruses that infect maize have

PALABRAS CLAVE

Virus de maíz; espiroplasma de maíz; infecciones mixtas; incidencia.

Introducción

El cultivo de maíz (*Zea mays* L.) es el cuarto más importante a nivel mundial. En México, aproximadamente el 70 % de la producción total proviene de ocho estados: Chiapas, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Puebla, Sinaloa y Veracruz (Juárez, 2013). Los virus son patógenos agrícolas importantes que causan pérdidas económicas significativas en la producción y en el rendimiento del cultivo dependiendo de la región geográfica (Ali & Yan, 2012). Éstos pueden ocurrir en infecciones simples o mixtas afectando procesos fotosintéticos y, algunos de ellos, también interfieren con el desarrollo vegetal. El número de reportes de infecciones mezcladas ha aumentado y aunque éstos describen nuevos problemas, también proveen de información valiosa para la búsqueda de estrategias de control (Rentería *et al.*, 2011).

El *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), o Virus del mosaico de enanismo del maíz, transmitido por áfidos, fue el primer virus reportado, el cual causa reducciones importantes en el cultivo de maíz en los Estados Unidos de Norteamérica. Este virus es un miembro del género de los *Potyvirus* dentro de la familia *Potyviridae*, que comprende a las especies virales más dañinas causantes de enfermedades de maíz en varias regiones del mundo, principalmente en algunos países asiáticos y europeos (Gell *et al.*, 2010). Recientemente las infecciones de maíz causadas por el *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) o Virus del moteado clorótico del maíz (del género *Machlomovirus*, familia *Tombusviridae*), y transmitido por trips, ha sido importante en algunos países (Silva-Rosales *et al.*, 2015; Wangai *et al.*, 2012). Otros virus como el *Maize necrotic streak virus* (MNeSV), también conocido como Virus del rayado necrótico del maíz; el *Maize rayado fino virus* (MRFV), conocido como Virus del rayado fino del maíz; y el *Maize fine streak virus* (MFSV), conocido como Virus de la ralladura fina del maíz, causan enfermedades en el cultivo. En América Central y del Sur, el MRFV causa el “rayado fino” o la enfermedad del “achaparramiento”, del maíz, que es una de las enfermedades conocidas más importantes para esta especie (Vásquez & Mora, 2007). En México se han reportado varios virus que infectan maíz como el MRFV,

been reported, such as MRFV, MCMV, *Maize mosaic nucleorhabdovirus* (MMV), (genus *Nucleorhabdovirus*, family *Rhabdoviridae*), transmitted by leafhoppers (*Dalbulus maidis*); and *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), (genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*), transmitted by aphids (Carrera et al., 1989; Espejel et al., 2006; Gordon et al., 1985). Other viruses, whose presence has not been reported so far are: *Maize stripe virus* (MSpV), (genus *Tenuivirus*, unassigned family) transmitted by leafhoppers (*Peregrinus maidis*); *brome mosaic virus* (BMV), (genus *Bromovirus*, family *Bromoviridae*), transmitted by aphids and nematodes (*Xiphinema sp.*); and *Maize white line mosaic virus* (MWLMV), (genus *Aureusvirus*, family *Tombusviridae*), transmitted by plasmodiophora.

Corn stunt disease, caused by *Spiroplasma kunkelii* (usually referred as corn stunt spiroplasma or CSS), transmitted by leafhoppers (*Dalbulus maidis*) can be a devastating disease in the American continent, particularly in areas with high temperatures and low relative humidity. In the field, CSS can co-infects maize plants together with MRFV, causing up to 40-50 % of crop losses (Gordon et al., 1985). CSS is one of the most important pathogens affecting maize productivity in Mexico and little is known about its distribution and incidence in this country (Alcántara-Mendoza et al., 2010). Also, in maize plants the “achaparramiento del maíz,” caused by three pathogens: *Spiroplasma kunkelii*, MDMV and MRFV have been detected, as well as the maize corn lethal necrosis disease (MLN or MLND or CLN), which is a result of mixed infections of MCMV, SCMV and/or other potyvirus. Potyviruses seem to be the most important worldwide, due to their economic impact (Redinbaugh & Pratt, 2009). Their incidence in combination with other viruses has not been fully addressed. However, a recent report from Ethiopia, pinpoints their importance with the presence of MLN and its negative effects on the maize sector (Mahuku et al., 2015).

Considering that interactions among viruses are widespread and crucial in viral evolution and also that crop damages, due to plant pathogens, may be prevented or at least reduced once they have been identified, we tested maize samples collected from Veracruz, Mexico. The objectives of this work were to identify the viruses that were present in this area and to determine if they can co-infect maize plants to the same extent and distribution in this corn-producer State.

MCMV, el *Maize mosaic nucleorhabdovirus* (MMV) o Virus del mosaico del nucleorhabdovirus, (género *Nucleorhabdovirus*, familia *Rhabdoviridae*), transmitido por chicharritas (*Dalbulus maidis*); y el *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), (género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*), transmitido por áfidos (Carrera et al., 1989; Espejel et al., 2006; Gordon et al., 1985). Otros virus cuya presencia no se ha reportado hasta ahora en este país son: *Maize stripe virus* (MSpV) o Virus del bandeo del maíz (género *Tenuivirus*, con familia no asignada), transmitido por chicharritas (*Peregrinus maidis*); el *Brome mosaic virus* (BMV) o Virus del mosaico del bromo, (género *Bromovirus*, familia *Bromoviridae*), transmitidos por áfidos y nemátodos (*Xiphinema sp.*); y el *Maize white line mosaic virus* (MWLMV) o Virus del mosaico de la línea blanca del maíz, (género *Aureusvirus*, familia *Tombusviridae*), transmitido por plasmodióforos.

El achaparramiento de maíz es causado por el *Spiroplasma kunkelii*, (comúnmente conocido como el espiroplasma del achaparramiento o CSS, por sus siglas del inglés del “Corn Stunt Spiroplasma”) y transmitido por chicharritas (*Dalbulus maidis*). Esta puede ser una enfermedad devastadora en el continente americano, particularmente en áreas con altas temperaturas y baja humedad relativa. En el campo el espiroplasma (CSS) puede co-infectar a las plantas de maíz conjuntamente con el MRFV causando de un 40 a 50 % de pérdidas del cultivo (Gordon et al., 1985). El CSS es uno de los patógenos más importantes que afectan a la productividad del maíz en México y se sabe muy poco de su distribución e incidencia en este país. (Alcántara-Mendoza et al., 2010). En el “achaparramiento del maíz”, también se han detectado tres patógenos: el *Spiroplasma kunkelii*, el MDMV y el MRFV. Por último, en maíz también se ha reportado la enfermedad de la necrosis letal (MLN por maize lethal necrosis o MLND por Maize Lethal Necrosis Disease), que resulta de las infecciones mezcladas de MCMV, SCMV y/u otro potyvirus. Los potyvirus parecen ser de los más importantes a nivel mundial debido a los impactos económicos que causan (Redinbaugh & Pratt, 2009). Su incidencia, en combinación con otros virus, no ha sido suficientemente descrita. Sin embargo, un reporte reciente de Etiopía señala su importancia debido a la presencia del MLN y sus efectos negativos en la producción de maíz (Mahuku et al., 2015).

Considerando que las interacciones entre virus están ampliamente distribuidas, que son cruciales en la evolución de virus y que los daños a los cultivos debidos a patógenos pueden ser prevenidos al ser identificados, en el presente trabajo se colectaron muestras de maíz en Veracruz, México. Los objetivos de este trabajo fueron identificar los virus presentes en esta área y determinar si están presentes en co-infecciones en el mismo grado, en plantas de maíz en este estado productor.

Materials and Methods

Sample collection

Maize samples were collected from four municipalities in Veracruz: Cosoleacaque, Paso de Ovejas, Medellín and Tlalixcoyan during 2006-2007 year survey (Table 1). Adult maize plantations were sampled at the onset of inflorescence emergence. A total of 228 leaf samples from 28 identified genotypes were collected, some showing putative viral symptoms such as chlorotic spots, yellowing, red streaks, necrosis and plant stunting. Midribs were removed from the collected leaves and the samples were placed in plastic bags inside an ice-filled box and further stored at -70 °C until ready for testing.

DAS-ELISA assays

The double-antibody sandwich indirect method of the enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) was performed using commercial kits which included reagent sets as well as positive and negative controls (Agdia, PathoScreen, Elkhart, IN). For these tests, 100 µl of crude leaf extracts (in 1:10 w/v extraction buffer) were used. The color reaction was developed using p-nitrophenyl phosphate (PNP), and the absorbance was read at 405 nm in a microtiter plate reader (Ultramark Bio-Rad). Maize leaf samples were tested against seven viruses to detect putative MDMV, SCMV, MCMV, MSpV, BMV, MMV and MWLMV Mexican strains. Also, CSS was surveyed using the same procedure. Virus positive and negative controls were included in all tests. Samples were positive when the absorbance value was at least three times greater than that of the negative controls.

Northern blot analysis

In the case of ELISA tests for SCMV and MDMV, cross reaction can occur using antibodies, as indicated by the manufacturer (Agdia Inc) and by our own previous experience. MDMV antibodies cross react with SCMV and not otherwise. In order to alleviate any possible ambiguity of a cross reaction, we hybridized, through Northern blots, RNAs from all the samples with a CP probe of a previously reported isolate from Veracruz SCMV-Mx (Espejel *et al.*, 2006). Northern blots were performed as previously reported (Lindbo & Dougherty, 1992). To this, total RNA was isolated from leaf tissue, using LiCl and ten micrograms were

Materiales y Métodos

Colecta de muestras

Las muestras de maíz se colectaron en cuatro municipios: Cosoleacaque, Paso de Ovejas, Medellín y Tlalixcoyan durante el periodo de los años 2006 a 2007 (Tabla 1). Las plantaciones de maíz muestreadas estaban en la etapa fenológica de emergencia de la flor. Se colectó un total de 228 muestras de hojas de 28 genotipos identificados; de éstas, algunas mostraban síntomas virales putativos como manchas cloróticas, amarillamientos, bandeados rojizos longitudinales, necrosis y achaparramientos. A las hojas colectadas se les removió la nervadura principal central y las dos mitades longitudinales de la hoja se guardaron en una bolsa plástica, en una caja con hielo para ser almacenadas a -70 °C en un ultracongelador hasta que fueron analizadas.

Ensayos tipo DAS-ELISA

El método indirecto de inmunoabsorción con enzima ligada (DAS-ELISA) se hizo usando cartuchos comerciales que incluían todos los reactivos, así como los controles positivos y negativos (Agdia, PathoScreen, Elkhart, IN). Para estos ensayos se usaron 100 µL de extracto crudo de hojas (diluidos 1:10 w/v en solución amortiguadora de extracción). El color de la reacción de la enzima ligada se reveló usando p-nitrofenil fosfato (PNP), y la absorbancia se leyó a 405 nm usando un lector de placa de microtítulo (Ultramark Bio-Rad). Las muestras de hojas de maíz se probaron contra siete virus para encontrar las variantes mexicanas putativas de: MDMV, SCMV, MCMV, MSpV, BMV, MMV y MWLMV. El CSS también se rastreó usando el mismo procedimiento. En todas las pruebas se usaron controles positivos y negativos. Las muestras fueron consideradas como positivas cuando el valor de la absorbancia fue por lo menos tres veces más grande que la de los controles negativos.

Análisis tipo Northern

En el caso de las pruebas de ELISA para SCMV y MDMV, puede haber reacción cruzada entre los anticuerpos, tal como lo indica la compañía manufacturera (Agdia Inc) y de acuerdo a nuestra experiencia previa. Los anticuerpos contra MDMV tienen reacción cruzada contra el SCMV, pero esto no ocurre en sentido opuesto. Para soslayar esta posible ambigüedad, en los ensayos se realizaron hibridaciones tipo Northern del RNA para cada muestra de Veracruz con una sonda de proteína de cubierta (CP) de un aislamiento, previamente reportado, el SCMV-Mx (Espejel *et al.*, 2006). Las hibridaciones tipo se realizaron según lo

separated by electrophoresis using 1.2 % formaldehyde denaturing agarose gel, transferred to Hybond N⁺ nylon membranes (Amersham) and cross-linked by exposure to UV radiation. Hybridization was performed using in-house prepared pre-hybridization and hybridization buffers and riboprobes labeled with [α -³²P] dCTP (Promega, *In vitro* transcription system). Hybridization was carried out 65 °C with the nylon membrane in a series of SSC (0.1 % sodium dodecyl sulfate and NaCl and 0.015 M sodium citrate solutions), with increasing stringency. We detected the hybridizing signal in a Storm 860 apparatus using the ImageQuant version 1.1 BioRad. We recorded a signal of 800 bp size band as positive for viral presence. Healthy plants were used as negative controls and a previously identified infected plant was used as positive control. Sequencing of the CP of selected samples was done by conventional Sanger sequencing of the RT-PCR amplified products using our institutional service.

Maize Genotypes identification

Genotypes identification was made by The International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) and the Regional Maize Program in Central America, who have developed some of these maize tropical hybrids (Jeffers *et al.*, 2004), as well as the National Institute for Forestry, Agricultural and Livestock Research (INIFAP) who developed the H-518, H-520 and H-513 (Sierra *et al.*, 2004).

Results and Discussion

Identification of virus and spiroplasma

A total of 228 maize samples were collected from the sampled municipalities (Figure 1 and Table 1) during the two-year survey. In all samples, we found 11 discrepancies between DAS-ELISA analyses and Northern hybridization for SCMV representing a 4.8 % variability between the two methods. These discrepancies are explained by the fact that the two techniques detect different viral components (coat protein in ELISA and genomic RNA in Northern blots). Sequencing the SCMV-CP cistron was done to confirm the nature of SCMV in the DAS-ELISA positive samples (Data not shown).

Virus identification and their abundance in Veracruz regions showed that about 46 % (105/228) of the tested plants

reportado previamente (Lindbo & Dougherty, 1992). Para este fin, se aisló RNA de tejido de hoja usando LiCl. Se separaron 10 μ g de RNA por electroforesis usando un gel de agarosa desnaturante al 1.2 % con formaldehído y se transfirió a membranas de nylon tipo Hybond N⁺ (Amersham). Una vez finalizado el tiempo de transferencia, el RNA se fijó a la membrana mediante la exposición a luz ultravioleta. La hibridación se llevó a cabo con soluciones amortiguadoras y ribosondas marcadas con deoxi-CTP [α -³²P] (sistema de transcripción *in vitro* de Promega), incubando la membrana de nylon a 65 °C con una serie de lavados de SSC (soluciones de 0.1 % de dodecil sulfato de sodio y NaCl con 0.015 M de solución de citrato de sodio), con astringencias crecientes. La señal de hibridación se detectó usando un equipo Storm 860 con la versión 1.1 de ImageQuant de BioRad. Se registró como positiva la presencia de virus en la muestra cuando la señal de una banda fue de 800 bp de talla. Se usaron plantas sanas como control negativo de la infección y como control positivo una planta que ya había sido previamente identificada como tal en nuestro grupo. Se hicieron secuenciaciones de nucleótidos tipo Sanger (servicio institucional de secuenciación), de la CP de muestras seleccionadas, después de haber amplificado los productos por RT-PCR.

Identificación de genotipos de maíz

La identificación de los genotipos de maíz se hizo por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y por el Programa Regional de Maíz de América Central que han desarrollado algunos de estos híbridos de maíces tropicales (Jeffers *et al.*, 2004), así como por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), quienes desarrollaron los híbridos H-518, H-520 and H-513 (Sierra *et al.*, 2004).

Resultados y Discusión

Identificación de virus y espiroplasma

Se colectó un total de 228 muestras de maíz de los municipios muestreados (Figura 1 y Tabla 1), durante los dos años que duró este estudio. Se encontraron 11 discrepancias, en todas las muestras, entre los análisis de DAS-ELISA y la hibridación tipo Northern para el SCMV. Esto representó una variabilidad de 4.8 % entre los dos métodos. Estas discrepancias se explican por el hecho de que las dos técnicas detectan dos componentes virales diferentes (en ELISA se detecta la proteína de la cubierta (CP) y en las hibridaciones tipo Northern, el RNA genómico). La secuenciación de nucleótidos de la CP del SCMV confirmó la naturaleza de

Table 1.
Origin of the maize collected samples
Tabla 1.
Origen de las muestras de maíz colectadas

County	Total of samples	Virus/CSS positive samples
Cosoleacaque	84	58
Tlalixcoyan	118	44
Medellin	5	1
Paso de Ovejas	21	1

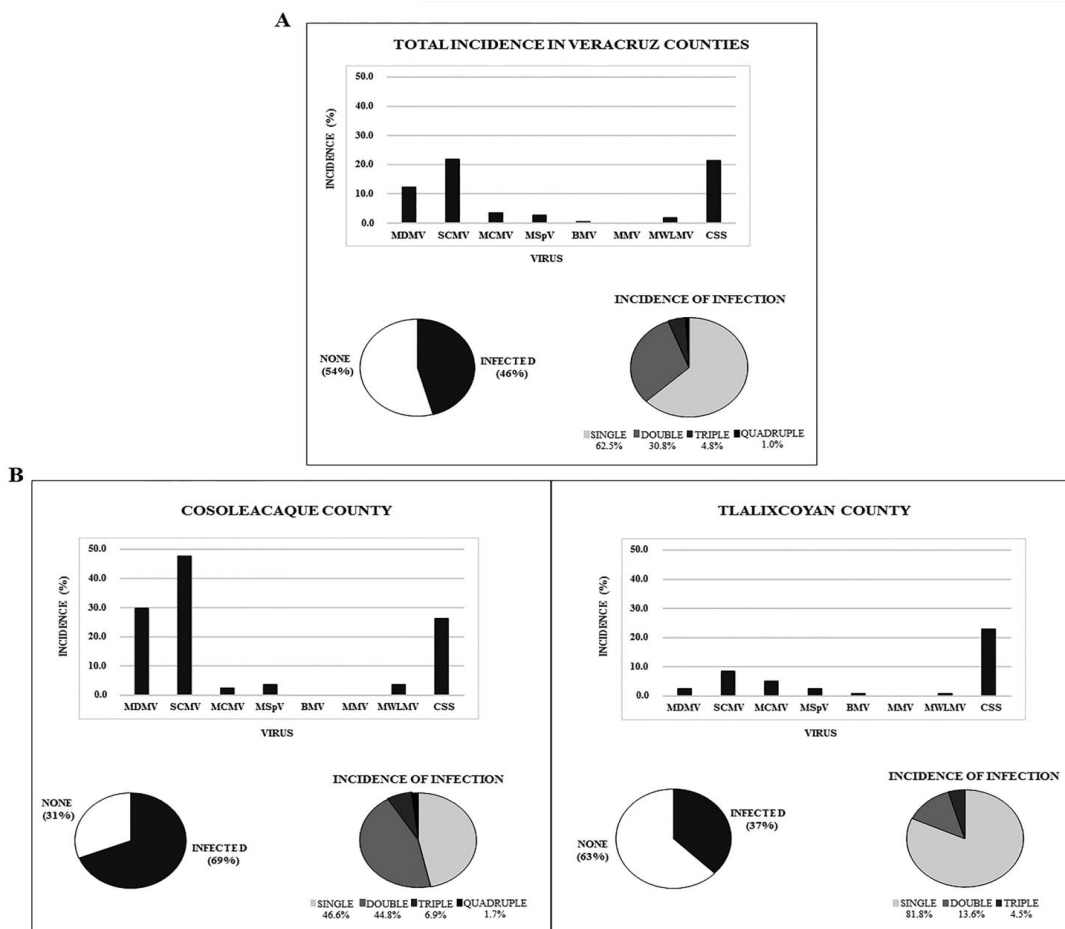


Figure 1. Relative abundance of six viruses and spiroplasma.

A) Results of the sum of all positive samples from all municipalities. B) Incidence in Cosoleacaque and Tlalixcoyan. In all cases, circles represent the distribution of infected and non-infected plants and types of mixed infections.

Figura 1. Abundancia relativa de seis virus y un espiroplasma.

A) Resultados de la suma de todas las muestras positivas de todos los municipios. B) Incidencia en Cosoleacaque y Tlalixcoyan. En todos los casos, los círculos representan la distribución de las plantas infectadas y no infectadas y los tipos de infecciones mixtas.

harbored at least one of the viruses and/or spiroplasma (Figure 1A). Laboratory testing of all samples collected indicated that their overall abundance of single, double, triple and quadruple infections was 62.5, 30.8, 4.8 and 1.0 %, respectively (Figure 1A). MDMV, SCMV, MCMV, MSpV, BMV and MWLMV were detected in single or mixed infections. MMV was absent whereas SCMV was the most common virus infecting 21.9 % (50/228) of the samples analyzed. CSS infection had similar abundances as SCMV with 49/228 (21.5 %). Together they were found in double, triple and quadruple infections (Table 2). CSS was followed in frequency by MDMV, MCMV, MSpV, MWLMV and BMV present in 12, 3.5, 2.6, 1.8 % and 0.4 %, respectively in the samples (Figure 1A). In the two-year survey, MDMV+SCMV was the most frequent double-infection combination in samples from the Cosoleacaque municipality as depicted on a pie chart (Figure 1B) and the most common triple infection was MDMV+SCMV+CSS. Only one sample was infected with the four-virus combination MDMV+SCMV+MCMV+MWLMV (Table 2).

Distribution and abundance of viruses, and spiroplasma

In the Cosoleacaque municipalities, a total of 84 samples were analyzed (Table 1) and about 69 % of them had single, double, triple and quadruple infections with a corresponding 31 % without viruses nor spiroplasma. The most predominant type of infection, represented on a pie chart, in this region, was the single infection with SCMV (48 % abundance), followed by the single infections as MDMV (30 %) and CSS (26 %), on 14 samples (Figure 1B). Only one plant was infected simultaneously with four viruses and triple infections were detected in four samples (Table 2). In these cases, MDMV and CSS prevailed. Infections with CSS spiroplasma were detected in single or mixed infections with MDMV, SCMV and MWLMV, but not with MCMV, MSpV and BMV. The viruses BMV and MMV were absent in Cosoleacaque (Figure 1B). MCMV was the virus with fewer occurrence in Cosoleacaque (2.4 %), being almost 20 times less than SCMV. The most common and widespread virus in the areas surveyed was SCMV, being Cosoleacaque the municipality with the most incidence of this virus. Also, this municipality was the location that registered the highest percentages of infected samples with viruses and spiroplasma infections.

las muestras que dieron positivas por DAS-ELISA (datos no mostrados).

La identificación de los virus y su abundancia en las regiones de Veracruz mostraron que el 46 % (105/228) de las plantas probadas contenían al menos uno de los virus o espiroplasma (Figura 1A). Las pruebas de laboratorio de todas las muestras colectadas indicaron abundancias de infecciones sencillas, dobles, triples y cuádruples de 62.5, 30.8, 4.8 y 1.0 %, respectivamente (Figura 1A) del MDMV, SCMV, MCMV, MSpV, BMV y del MWLMV que se detectaron en infecciones sencillas o mezcladas. El MMV estuvo ausente mientras que el SCMV fue el virus más común, infectando al 21.9 % (50/228) de las muestras analizadas. La infección con CSS tuvo una abundancia similar al SCMV con 49/228 (21.5 %). Ambos se encontraron conjuntamente en infecciones dobles, triples y cuádruples (Tabla 2). La infección con CSS fue seguida en frecuencia por el MDMV, MCMV, MSpV, MWLMV y el BMV, presentes en un 12, 3.5, 2.6, 1.8 % y un 0.4 %, respectivamente en las muestras (Figura 1A). En los dos años que duró el estudio, MDMV+SCMV fue la combinación doble de infección más frecuente en las muestras del municipio de Cosoleacaque, como se puede ver en la Figura 1B, mientras que la infección triple más común fue MDMV+SCMV+CSS. Solamente encontramos una muestra infectada con la combinación cuádruple de MDMV+SCMV+MCMV+MWLMV (Tabla 2).

Distribución y abundancia de virus y espiroplasma

En el municipio de Cosoleacaque se analizó un total de 84 muestras (Tabla 1), el 69 % de ellas tenían infecciones sencillas dobles, triples y cuádruples, mientras que el 31 % no tenían virus ni espiroplasma. El mayor tipo predominante de infección en esta región, representada en la gráfica de pastel, fue la infección sencilla con SCMV (48 % de abundancia), seguida por las infecciones sencillas de MDMV (30 %) y CSS (26 %), en 14 muestras (Figura 1B). Solamente una planta estuvo infectada simultáneamente con cuatro virus y las infecciones triples se detectaron en cuatro muestras (Tabla 2). En estos casos, el MDMV y el CSS prevalecieron. El espiroplasma CSS fue detectado en infecciones sencillas o mezcladas con MDMV, SCMV y MWLMV, pero no con MCMV, MSpV ni BMV. Los virus BMV y MMV estuvieron ausentes en Cosoleacaque (Figura 1B). MCMV fue el virus con menor ocurrencia en Cosoleacaque (2.4 %), estando 20 veces menos que el SCMV. El virus más común y disperso en el área de estudio fue el SCMV. El municipio de Cosoleacaque fue el que presentó mayor incidencia de este virus. Este municipio también fue la localidad que registró los porcentajes más altos de muestras infectadas con virus y con espiroplasma.

Table 2.
Maize viruses in single or mixed infections
Tabla 2.
Virus del maíz en infecciones simples y mixtas

Cosoleacaque county								
No. of samples with virus	MDMV	SCMV	MCMV	MSPV	BMV	MMV	MWLMV	CSS
20	+	+	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	+
1	+	-	-	-	-	-	+	+
3	+	+	-	-	-	-	-	+
10	-	+	-	-	-	-	-	-
1	+	+	+	-	-	-	+	-
4	-	+	-	-	-	-	-	+
1	-	+	-	-	-	-	+	-
1	-	+	-	+	-	-	-	-
1	-	-	+	-	-	-	-	-
Tlalixcoyan municipality								
4	-	-	+	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	+
3	+	+	-	-	-	-	-	-
1	-	-	+	-	-	-	-	+
1	-	-	-	-	+	-	-	-
1	-	-	-	+	-	-	-	+
2	-	-	-	+	-	-	-	-
6	-	+	-	-	-	-	-	-
1	+	+	-	-	-	-	-	+
1	-	+	+	-	-	-	+	-
1	-	+	-	-	-	-	-	+
Medellin and Paso de Ovejas municipality								
2	-	-	-	-	-	-	-	+

In the Medellin municipality, we only collected five samples from maize fields. Viruses were not detected in samples from this region and only one plant was positive for CSS infection. In Paso de Ovejas, 21 samples from four regions were analyzed with similar results as those from Medellin, no viruses were detected but one sample had CSS infection. In the Tlalixcoyan municipality, 118 samples were collected (Table 1). In this municipality 63 % of the plants analyzed were free of virus or CSS but 37 % (44/118) of the samples were infected (Figure

En el municipio de Medellín, solamente colectamos cinco muestras de los campos de maíz. No se detectaron virus, y solamente una planta fue positiva para infección con CSS. En Paso de Ovejas, se analizaron 21 muestras de cuatro regiones con resultados similares a los de Medellín. No se detectaron virus, y solamente una muestra presentaba infección por CSS. En el municipio de Tlalixcoyan se colectaron 118 muestras (Tabla 1). En este municipio el 63 % de las plantas analizadas no presentaban virus o CSS; sin embargo, el 37 % de ellas (44/118) estaban infectadas (Figura 1B). De estas, las

1B). Of these, single infection was predominant (81.8 %), with CSS prevailing. SCMV was also present in 10 positive samples (8.5 % abundance on Figure 1B) being the most common virus in this county. In triple infections, SCMV virus was prevalent. Infection with CSS spiroplasma was present in 23 % of the samples. In Tlaxicoyan, CSS was present in single or mixed infection with diverse viruses such as MDMV, SCMV, MCMV and MSpV but not with BMV, MMV nor MWLMV (Table 2). However, plants infected with BMV in a single or mixed infection were detected, in contrast to results obtained from Cosoleacaque, Medellín and Paso de Ovejas. MMV virus was not detected in any sample analyzed. MCMV virus had a 5 % abundance followed by MDMV and MSpV with 2.5 %. Less occurring viruses in Tlaxicoyan were BMV and MWLMV, with 0.8 % (Figure 1B). The absence of MMV and lower occurrence of MSpV could be explained to a lower presence of the leafhopper (*Peregrinus maidis*) vector. In fact, we only found one report of the presence of MMV and its vector in Tabasco in 1984 (Rocha-Pena et al., 1984). However, we did not survey for the distribution of this vector in the areas of study. The higher amount of viral incidence of SCMV and MDMV could be due to differences in temperatures between Cosoleacaque and Tlaxicoyan municipalities registered by Conagua Services (Weather Service in Mexico), (Conagua 2018). Indeed changes in temperature favours differences in populations of insect vectors like aphids (Yañez-Morales & Peña-Martínez 1991). On the contrary, we would assume that cicadellidae population (leafhoppers) might not be fluctuating as much as that of the aphids, as they have a wide oviposition temperature range (15–40 °C) (Van Nieuwenhove et al., 2016), guaranteeing their similar population levels with a concomitant prevalence of CSS in both locations. The results of the surveys showed that MDMV, SCMV, MCMV, MSpV, BMV and MWLMV were viruses that infected maize grown in the Veracruz regions. In Mexico, SCMV was first reported in maize in 2006. This virus can infect different crops (e.g., maize, sorghum and sugarcane) causing symptoms such as chlorosis, mosaics and stunting (Espejel et al., 2006). During the surveys reported here, we observed maize plants with the characteristic symptoms of a SCMV infection, and in our diagnosis assays, we confirmed the prevalence of this virus. In the early phase of an epidemic, one individual becomes infected with a single virus at a time; when the epidemic continues, an increase in the density of virus population occurs

infecciones sencillas fueron predominantes (81.8 %), y CSS prevaleció. El SCMV estuvo presente en 10 muestras que dieron positivas para este virus (8.5 % de abundancia en la Figura 1B) y fue por lo tanto el virus más común en este municipio. En infecciones triples, el SCMV fue el virus más abundante, y las infecciones con el espiroplasma estuvieron presentes en el 23 % de las muestras. En Tlaxicoyan, el CSS estuvo presente en infecciones sencillas o mezcladas con diversos virus como el MDMV, SCMV, MCMV y el MSpV pero estuvieron ausentes el BMV, MMV y el MWLMV (Tabla 2). Sin embargo, se detectaron plantas en infecciones sencillas o mezcladas con el BMV, a diferencia de los encontrado en Cosoleacaque, Medellín o Paso de Ovejas. El MMV no se detectó en ninguna de las muestras analizadas. El MCMV tuvo una abundancia del 5 % seguido por el MDMV y el MSpV con un 2.5 %. Por otro lado, los virus con menor ocurrencia en Tlaxicoyan fueron el BMV y el MWLMV con un 0.8 % (Figura 1B). La ausencia de MMV y la menor ocurrencia del MSpV se puede explicar en términos de la baja presencia de la chicharrita (*Peregrinus maidis*) que es vector de este virus. De hecho, solamente encontramos un reporte de la presencia de MMV y de su vector en Tabasco en 1984 (Rocha-Pena et al., 1984). Cabe mencionar que en este estudio no se buscaba la distribución de este vector en nuestras áreas de estudio. La alta incidencia de SCMV y de MDMV podría ser debida a diferencias de temperatura entre los municipios de Cosoleacaque y Tlaxicoyan, registrados por los servicios de Conagua (Servicios Meteorológicos en México), (Conagua, 2018). Es sabido que los cambios en temperatura favorecen las poblaciones de insectos vectores como son los áfidos (Yañez-Morales & Peña-Martínez, 1991). Por el contrario, podríamos asumir que las poblaciones de cicadélidos no fluctuarían tanto como las de los áfidos ya que tienen amplios rangos de temperaturas de oviposición que están en el rango de 15 a 40 °C (Van Nieuwenhove et al., 2016). Esto garantizaría niveles poblacionales similares con la prevalencia concomitante de CSS en ambas localidades. Los resultados de nuestras búsquedas sugirieron que MDMV, SCMV, MCMV, MSpV, BMV y MWLMV son virus que infectan plantas de maíz crecidas en la región de estudio en Veracruz. En México, el SCMV se reportó en 2006 por primera vez. Este virus puede infectar diferentes cultivos (por ejemplo, maíz, sorgo y caña de azúcar), causando síntomas como clorosis, mosaicos y achaparramientos (Espejel et al., 2006). Los resultados reportados en este estudio, indican que las plantas de maíz presentan síntomas característicos de una infección con SCMV y con los ensayos de diagnóstico confirmamos la prevalencia de este virus. En las fases tempranas de una epidemia, un individuo se infecta con un tipo de virus; cuando la epidemia continúa hay un incremento en la densidad de las poblaciones virales

and raises the possibilities for mixed viral infections (Lamichhane & Venturi, 2015; Xia *et al.*, 2016). SCMV and all other viruses analyzed in this study were found in single or mixed infections. During our analysis, we detected the occurrence of MCMV co-infecting maize plants with SCMV and MWMLV in a triple infection; and in a quadruple infection with MDMV, SCMV and MWLMV. MCMV was also in mixed infections not only with other viruses, but also with CSS. At the present, we are not aware of any study addressing the interaction of viruses with CSS and their effect on disease severity. In this study, MDMV was also found in the areas surveyed with 12 % abundance. Mixed infections were previously reported involving MDMV with MRFV, SCMV or MCMV viruses (Redinbaugh & Pratt, 2009) but not with MWLMV as we report here, or with SCMV, MCMV and MWLMV in a double, triple and quadruple infections. During this survey, we detected MSpV, BMV and MWLMV in single or mixed infections. These viruses have been reported in several countries (Sharma & Misra, 2011); however, in Mexico, there are no reports of their presence. In this study, we found that these viruses are present infecting maize fields, not only in a single manner, but also in combination with other viruses and spiroplasma.

Corn stunt disease (CSD) is considered one of the most economically significant diseases of maize in the United States, Mexico and Central and South America. The severe stunt maize disease can be caused by the interaction of three pathogens: MRFV, CSS and Maize bushy stunt spiroplasma (Bradfute, Tsai & Gordon, 1981). Previous studies about presence of CSS, revealed their high prevalence and wide distribution in Mexico and confirm that maize plants are often infected with this phytopathogen (Alcántara-Mendoza *et al.*, 2010; Gordon *et al.*, 1985). CSS was identified in some samples from all areas analyzed. This spiroplasma was found in co-infections with MDMV, SCMV, MCMV, MSpV and MWLMV in a double, triple and quadruple infection (Table 2).

Maize genotypes and virus incidence

In this study, we try to correlate the genotypes of maize samples with the incidence of infection. Among our samples, we found 28 maize genotypes (Table 3). Twenty-eight maize genotypes were identified among the samples collected and 22 of them showed single or mixed infection with viruses and/or spiroplasma.

y esto aumenta la posibilidad de infecciones mezcladas (Lamichhane & Venturi, 2015; Xia *et al.*, 2016). El SCMV y los demás virus analizados en este estudio se encontraron en infecciones sencillas y mezcladas. Durante nuestros análisis detectamos la ocurrencia del MCMV coinfectando plantas de maíz con SCMV y MWMLV, en infección triple, y en una cuádruple con el MDMV, SCMV y el MWLMV. El MCMV se encontró, no solamente en infecciones mezcladas con otros virus, sino también con el CSS. Hasta ahora, no hemos encontrado otro estudio dirigido a buscar interacciones de virus con CSS y su efecto en la severidad de la enfermedad. En este estudio el MDMV se encontró en las áreas rastreadas con una abundancia del 12 %. Las infecciones mezcladas con la participación del MDMV y MRFV, SCMV o MCMV ya había sido reportada previamente (Redinbaugh & Pratt, 2009), pero no con el MWLMV, como lo reporta este estudio, o con SCMV, MCMV y MWLMV en infecciones dobles, triples y cuádruples. Durante nuestro estudio detectamos al MSpV, BMV y al MWLMV en infecciones sencillas o mezcladas. Estos virus ya han sido reportados en varios países (Sharma & Misra, 2011); sin embargo, en México no se había descrito su presencia. En este trabajo se reporta la presencia de estos virus infectando los campos de maíz en infecciones sencillas y en combinación con otros virus y con espiroplasma.

La enfermedad severa del achaparramiento (CSD) o “complejo del achaparramiento”, es considerada como una de las enfermedades económicamente más impactantes en los Estados Unidos de Norteamérica, México, América Central y América del Sur. Esta enfermedad severa de achaparramiento puede ser causada por la infección de tres patógenos: el MRFV, el CSS o el fitoplasma arbustivo del Maíz (MBS) (Bradfute, *et al.*, 1981). Estudios previos sobre la presencia del CSS mostraron su alta prevalencia y amplia distribución en México y confirmaron que las plantas de maíz están frecuentemente infectadas con este fitopatógeno (Alcántara-Mendoza *et al.*, 2010; Gordon *et al.*, 1985) y se identificó en algunas de las muestras de todas las áreas analizadas. Este espiroplasma CSS se encontró en co-infecciones con el MDMV, SCMV, MCMV, MSpV y el MWLMV en infecciones dobles, triples y cuádruples (Tabla 2).

Genotipos de maíz e incidencia de virus

En este estudio tratamos de correlacionar los genotipos de las muestras de maíz con la incidencia de la infección. Encontramos que las muestras analizadas pertenecían 28 genotipos de maíz (Tabla 3), y 22 de ellas mostraron infecciones sencillas o mezcladas con virus y/o espiroplasma. Solamente uno de los genotipos, el 24, 1/33

Only one genotype 24. 1/33 A-7573 /Tornado showed a quadruple infection and we therefore cannot claim this as a susceptible genotype to a multiple viral infection. The genotype mostly collected was A-7573 including 117 samples and distributed in Cosoleacaque, Paso de Ovejas and Tlalixcoyan. Out of the total of these genotype samples, 38 % (44/117) harbored at least one virus or spiroplasma. Criollo and VS-536 genotypes were identified in 13 and 11 samples respectively (Table 3). In both cases, 9 samples were positive to virus and/or spiroplasma diagnosis. Forty-nine samples belonged to diverse genotypes distributed in all communities. Thirty-eight samples did not correspond any of the genotypes analyzed. These unknown genotypes samples were distributed along all communities and 29 % (11/38) showed single or mixed infection by viruses and/or spiroplasma. In the present study, the prevailing genotype in the survey was A-7573, which had previously been identified as susceptible to corn stunt disease (Sierra-Macías et al., 2010). On the other hand, four samples were identified as H520. It was reported that the genotypes with greater tolerance to the stunt maize disease are H-520, H-513, H-518 and C343, representing an alternative in commercial sowings for maize production in Veracruz state, with a possible resistance to maize stunt disease (Sierra-Macías et al., 2010).

We cannot discard that the presence of seasonal vectors pose an increase pressure of viruses to the host (maize) plants, in the different regions and seasons of the year. For instance, among the different vectors for the viruses detected in this report, like aphids, leafhoppers, nematodes and even plasmodiophora, the first group increases in populations during fall and winter when most of the samples were collected. Undoubtedly, more studies about virus identification, occurrence and distribution must be made in Mexican maize fields.

Conclusions

We found simultaneous infections with more than two viruses in maize plants with or without CSS in Veracruz, Mexico. The results obtained in this study, agree with reports about the high occurrence and extensive dissemination of CSS, revealing how this pathogen, can associate with maize viruses and increase corn diseases severity in Mexican fields.

A-7573 /Tornado mostró una infección cuádruple, pero, no por ello, lo podemos asignar como susceptible a infecciones virales múltiples. El genotipo más frecuentemente colectado fue el A-7573 que incluyó 117 muestras y que estuvo distribuido en Cosoleacaque, Paso de Ovejas y Tlalixcoyan. De todos los genotipos colectados, el 38 % (44/117) tenía por lo menos un virus o espiroplasma. Los genotipos Criollo y VS-536 se identificaron en 13 y 11 muestras respectivamente (Tabla 3). En ambos casos, 9 muestras fueron positivas para el diagnóstico de virus y/o espiroplasma. Cuarenta y nueve muestras pertenecieron a diferentes genotipos distribuidos en todas las comunidades. Treinta y ocho muestras no correspondieron a los genotipos analizados. Estos genotipos desconocidos se distribuyeron en todas las comunidades muestreadas y el 29 % de ellos mostró infecciones sencillas o mezcladas por virus y/o espiroplasma. El genotipo prevalente en este estudio fue el A-7573 que había sido identificado anteriormente como susceptible al achaparramiento del maíz. (Sierra-Macías et al., 2010). Por otro lado, cuatro muestras fueron identificadas como H520. Se ha reportado que los genotipos H-520, H-513, H-518 y C343 tienen mayor tolerancia a la enfermedad del achaparramiento y por lo tanto representan una estrategia alternativa comercial de siembra para la producción de maíz en el estado de Veracruz, con una posible resistencia a la enfermedad del achaparramiento del maíz (Sierra-Macías et al., 2010).

No podemos descartar la presencia de vectores estacionales que representan un aumento en la presión de virus al hospedero (maíz), en las diferentes regiones del estado y estaciones del año. Por ejemplo, de entre los diferentes vectores de los virus detectados en este reporte, como lo son áfidos, chicharritas, nemátodos y plasmidióforos, el primer grupo aumenta sus poblaciones durante el otoño, sin embargo en invierno fue el periodo durante el cual se colectaron la mayoría de las muestras. Sin duda alguna, se requiere hacer más trabajos de identificación, ocurrencia y distribución de virus en los campos mexicanos de maíz.

Conclusiones

Encontramos infecciones simultáneas con más de dos virus en plantas de maíz con o sin CSS en el estado de Veracruz, México. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con reportes sobre la extensa disseminación del CSS, revelando como este patógeno puede asociarse con virus de maíz y aumentar la severidad de las enfermedades del maíz en los campos mexicanos.

Table 3.
Maize genotypes in Veracruz Regions

Tabla 3.
Genotipos del maíz en regiones de Veracruz

Genotipo	No. de muestras	Comunidad	Infección Positiva
24. 1/33 A-7573 /Tornado	1	Cosoleacaque	1/1
30. 10/6 criollo /VS-536	1	Cosoleacaque	1/1
40. 6/33 VS-536 /Tornado	1	Cosoleacaque	1/1
45. 6/10 VS-536 / criollo	1	Cosoleacaque	1/1
48. 33/1 Tornado/A-7573	1	Cosoleacaque	1/1
53. 1/10 A-7573/criollo	1	Cosoleacaque	1/1
57. 1/55 A-7573/N.I	1	Cosoleacaque	1/1
58. 6/10 VS-536/criollo	1	Cosoleacaque	0/1
A-7573	117	Cosoleacaque; Paso de Ovejas; Tlaxicoyan	44/117
CP	1	Tlaxicoyan	1/1
CP-560A	3	Cosoleacaque; Tlaxicoyan	2/3
CP-562	1	Tlaxicoyan	0/1
CP-562A	3	Cosoleacaque; Tlaxicoyan	2/3
Criollo	13	Cosoleacaque	9/13
H-520	4	Cosoleacaque; Medellin; Tlaxicoyan	2/4
HQ1	3	Cosoleacaque; Tlaxicoyan	3/3
HQ2	4	Cosoleacaque; Tlaxicoyan	2/4
HQ3	1	Tlaxicoyan	0/1
HQ4	3	Cosoleacaque; Tlaxicoyan	3/3
Nutria	2	Cosoleacaque; Tlaxicoyan	2/2
T-501	1	Tlaxicoyan	0/1
Tornado	8	Cosoleacaque	7/8
V-536C	1	Tlaxicoyan	0/1
V-537C	1	Tlaxicoyan	0/1
V-556AC	1	Tlaxicoyan	1/1
VAN-543	2	Cosoleacaque; Tlaxicoyan	2/2
VS-536	11	Cosoleacaque; Tlaxicoyan	9/11
VS-543R	2	Cosoleacaque; Tlaxicoyan	2/2
ND	38	Cosoleacaque; Medellin; Paso de Ovejas; Tlaxicoyan	11/38

Although the survey was made during 2006-2007, this study becomes important because is the first report of novel associations between CSS and viruses SCMV, MCMV, MSpV and MWLMV in Mexico.

Aunque este estudio se condujo durante el periodo de los años 2006-2007, es de importancia mencionar que es el primer reporte de asociaciones novedosas entre el CSS y los virus SCMV, MCMV, MSpV y MWLMV en México.

Acknowledgments

This work was carried out with funds from SEP-CONACYT 0157638 and SAGARPA.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo con fondos públicos de SEP-CONACYT 0157638 y SAGARPA.

References

- Alcántara-Mendoza, S., Téliz-Ortíz, D., De León, C., Cárdenas-Soriano, E., Hernández-Anguiano, A. M., Mejía-Sánchez, D. and De La Torre-Almaraz, R. (2010). Detección y evaluación del fitoplasma *Maize Bushy Stunt* en el Estado de Veracruz, México. *Revista mexicana de fitopatología.*, 28: 34-43. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61214206004>.
- Ali, F. & Yan, J. (2012). Disease resistance in maize and the role of molecular breeding in defending against global threat. *Journal of Integrative Plant Biology.*, 54(3): 134-151. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01105.x>
- 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. http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1981Articles/PlantDisease65n10_837.PDF
- Carrera Martínez, H., Lozoya Saldana, H., Mendoza Zamora, C., and Alvizo Villasana, H. (1989). Inmunoabsorción enzimática (ELISA) en la identificación y distribución del Virus Moteado Clorotico del Maiz (VMCM) en el Estado de Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 7: 20-25. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-mexicana-de-fitopatologia/articulo/inmunoabsorcion-enzimatica-elisa-en-la-identificacion-y-distribucion-del-virus-moteado-clorotico-del-maiz-vmcm-en-el-estado-de-mexico>
- CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. (2018) [Last checked 2nd April 2018].
- Espejel, F., Jeffers, D., Noa Carrazana, J. C., Ruiz Castro, S. and Silva Rosales, L. (2006). Coat protein gene sequence of a Mexican isolate of *Sugarcane mosaic virus* and its infectivity in maize and sugarcane plants. *Archives of Virology*, 151(2): 409-412. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0645-3>
- Gell, G., Balazs, E., and Petrik, K. (2010). Genetic diversity of Hungarian *Maize dwarf mosaic virus* isolates. *Virus Genes*, 40: 277-281. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0434-2>
- 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. http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1985Articles/PlantDisease69n02_108.PDF
- Jeffers, D., Martínez-Hernández, L., Bergvinson, D., Córdova, H., and Beck, D. 2004. Avances en el Desarrollo de Germoplasma Resistente al Complejo del Achaparramiento del Maíz en el CIMMYT. In: Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología. Resumen C-62. México.
- Juárez, B. (2013). Favorable growing conditions for a higher corn, wheat, and dry beans forecast, sorghum mixed, rice down. *GAIN Report Number: MX3024*.
- Lamichhane, J. R. & Venturi, V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in Plant Science.*, 6: 385. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385>
- Lindbo, J. A., & Dougherty, W. G. (1992). Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 5(2): 144-153. http://www.apsnet.org/publications/mpmi/backissues/Documents/1992Articles/Microbe05_144.pdf
- Mahuku, G., Lockhart, B. E., Wanjala, B., Jones, M. W., Kimunye, J. N., Stewart, L. R. and Redinbaugh, M. G. (2015). *Maize Lethal Necrosis* (MLN), an emerging threat to maize-based food security in Sub-Saharan Africa. *Phytopathology*, 105(7): 956-965. <https://doi.org/10.1094/phyto-12-14-0367-FI>
- Redinbaugh, M. G. & Pratt, R. C. (2009). Virus resistance. In: Bennetzen J. L. and Hake (eds) Handbook of maize: Its Biology. *Springer, New York*, 251-270. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1>

- Renteria Canett, I., Xoconostle Cazares, B., Ruiz Medrano, R. and Rivera Bustamante, R. F. (2011). Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal*, 8: 104. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-104>
- Rocha-Pena M.A., Monreal C.T., Becerra E.N. and Ruiz P. (1984) Occurrence of maize stripe virus in Tabasco State, Mexico [Peregrinus maidis]. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AG19860074142>
- Sharma, K. & Misra, R. S. (2011). Molecular approaches towards analyzing the viruses infecting maize (*Zea mays* L.). *Journal of General and Molecular Virology*, 3(1) 1-17. <http://www.academicjournals.org/journal/JGMV/article-full-text-pdf/83EC86310868>.
- Sierra-Macias, M., Becerra-Leor, E. N., Palafox-Caballero, A., Rodríguez-Montalvo, F., Espinoza-Calderón, A. and Valdivia-Bernal, R. (2010). Tropical corn (*Zea mays* L) genotypes with high yield and tolerance to corn stunt disease in the Gulf of Mexico region. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(2010): 485-493. <http://www.redalyc.org/pdf/939/93915170009.pdf>.
- Sierra, M. M., Palafox, C. A., Rodríguez, M. F. A., Espinoza, C. A., Gómez, M. N., Caballero, H. F. and Zambada, M. A. (2004). H-518 y H-520, Híbridos trilineales de maíz para el trópico húmedo de México. *INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Cotaxtla. Folleto Técnico Núm. 38. Veracruz, México.*, 17. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3504>
- Silva Rosales, L., Espejel, F. and Alcalá Briseño, R. (2015). Chapter 11. Mosaic diseases VII: *Sugarcane mosaic virus* in: "Virus diseases of tropical and subtropical crops", (Tennant, P. and Fermin, G. Eds), CABI Plant Protection Series No. 3: ISBN: 978-1-78064-426-4. 131-143.
- Van Nieuwenhove, G. A., Frías, E. A. and Viria, E. G. (2016). Effects of temperature on the development, performance and fitness of the corn leafhopper *Dalbulus maidis* (DeLong) (Hemiptera: Cicadellidae): implications on its distribution under climate change. *Agricultural and Forest Entomology*, 18: 1–10. <https://doi.org/10.1111/afe.12118>
- Vasquez, J. & Mora, E. (2007). Incidence of and yield loss caused by *Maize rayado fino virus* in maize cultivars in Ecuador. *Euphytica*, 153: 339-342. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-3889-4>
- Wangai, A. W., Redinbaugh, M. G., Kinyua, Z. M., Miano, D. W., Leley, P. K., Kasina, M. and Jeffers, D. (2012). First report of Maize chlorotic mottle virus and Maize lethal necrosis in Kenya. *Plant Disease* 96: 1582-1583. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-12-0576-PDN>
- Xia, Z., Zhao, Z., Chen, L., Li, M., Zhou, T., Deng, C. and Fan, Z. (2016). Synergistic infection of two viruses MCMV and SCMV increases the accumulations of both MCMV and MCMV-derived siRNAs in maize. *Scientific Reports.*, 6 : 20520. <https://doi.org/10.1038/srep20520>
- Yañez-Morales, M. J. & Peña-Martínez, M. R. (1991). Áfidos (Homoptera : Aphididae) de la Planicie Huasteca, México. *Folia Entomológica Mexicana*. 82: 69-82.