



Nota Fitopatológica

Hoja pequeña de *Bocconia frutescens*, nueva enfermedad asociada a una raza relacionada a ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’ en Costa Rica

William Villalobos Muller, Laura Garita Salazar, Ana María Conejo Barboza, Laboratorio de Fitopatógenos Obligados y sus Vectores, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, 11500-2060 San José, Costa Rica; **Izayana Sandoval Carvajal, Mauricio Montero Astúa, Lisela Moreira Carmona***, Laboratorio de Fitopatógenos Obligados y sus Vectores, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), y Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica, 11500-2060 San José, Costa Rica.

*Autor de
correspondencia:

Lisela Moreira-Carmona
lisela.moreira@ucr.ac.cr,
lisela.moreira@gmail.com

Sección:
Edición periódica

Recibido:
05 Marzo, 2024

Aceptado:
05 Junio, 2024

Publicado:
20 Junio, 2024

Cita:

Villalobos MW, Garita SL,
Conejo BAM, Sandoval CI
et al., 2024. Hoja pequeña
de *Bocconia frutescens*,
nueva enfermedad asociada
a una raza relacionada a
‘*Candidatus Phytoplasma
pruni*’ en Costa Rica.
Revista Mexicana de
Fitopatología 42(3): 25
[https://doi.org/10.18781/
R.MEX.FIT.2403-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2403-1)

RESUMEN

Objetivo/Antecedentes. *Bocconia frutescens* (Papaveraceae) es un árbol pequeño, distribuido naturalmente desde México hasta Argentina y en la cuenca del Caribe. Árboles de *Bocconia* con síntomas semejantes a los inducidos por fitoplasmas, como hoja pequeña y escobas de bruja, fueron encontrados en la provincia de Cartago, Costa Rica. Detectar e identificar al posible fitoplasma asociado con dichos síntomas fue el objetivo de este estudio.

Materiales y Métodos. Se evaluó tejido foliar empleando microscopía electrónica de transmisión (TEM), PCR anidada empleando cebadores universales y específicos para amplificar los genes ARNr 16S, y *secA* de fitoplasmas. Las secuencias nucleotídicas (método Sanger) obtenidas de los amplicones, se emplearon para BLASTn, análisis filogenéticos y RFLP’s *in silico*.

Resultados. La presencia de fitoplasmas en el tejido del floema se observó mediante TEM solamente en los árboles sintomáticos. Los diferentes análisis con las secuencias parciales (genes 16Sr y *secA*) indicaron la presencia de una cepa relacionada al ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’ en las muestras evaluadas.

Conclusión. Fitoplasmas se encontraron sólo en los árboles sintomáticos de *Bocconia* evaluados. Los fitoplasmas se identificaron como una cepa relacionada al ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’. Este es el primer reporte de *B. frutescens* como un hospedero natural de ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’.



Palabras clave: Papaveraceae, PCR semi-anidado, RFLP's *in silico*, 16SrIII-F, gen *secA*

INTRODUCCIÓN

Bocconia frutescens (Papaveraceae) es un árbol de porte pequeño (2 a 3 m de altura), es una especie de corta vida y demandante de luz, se encuentra distribuido naturalmente desde México y Centroamérica, hasta Argentina y en las islas del Caribe. Es una especie invasora, por introducción, en las islas de Hawaii y en la Isla Reunión (Sherley 2000, Tassin *et al.* 2006). Se le conoce con diferentes nombres: “llora sangre”, “trompeto”, “cacho venado”, “plume-poppy”, “parrot weed”, “bois codine”, etc. (Francis, 2004). En Costa Rica, se le llama guacamayo, tabaquillo, cola de gallo y tora (Soto, 2007), y se distribuye entre los 100 y 3300 m.s.n.m. en las vertientes del Pacífico y del Atlántico, a lo largo de caminos, vegetación riparia, en campos abiertos y claros de bosque (Boucher y Nishida, 2014). Varios tipos de tejidos de *B. frutescens* se emplean en medicina etnobotánica, y evaluaciones *in vitro* de diferentes extractos de esta especie han mostrado actividad contra diferentes microorganismos. Sin embargo, diferentes alcaloides han sido identificados en esta especie (Lunagómez *et al.*, 2020).

Varios árboles de *B. frutescens* con síntomas sugestivos de infección por fitoplasmas (Lee *et al.*, 2000, Hogenhout *et al.*, 2008, Maejima *et al.*, 2014) se observaron en áreas de sucesión secundaria, bordes de caminos, orillas de ríos y riachuelos, en varias localidades en la provincia de Cartago, Costa Rica.

Los fitoplasmas (clase Mollicutes) pueden inducir diferentes síntomas en las plantas que infectan, incluyendo escobas de bruja (“witches'-broom”), enanismo y amarillamiento. Éstos causan diferentes enfermedades en plantas alrededor del mundo y son los responsables de daños devastadores para muchos cultivos de importancia económica y para los ecosistemas naturales. Estos mollicutes fitopatógenicos son procariotes diminutos, desprovistos de pared celular, y que habitan en el floema de las plantas hospederas o infectando diferentes tejidos de las especies de insectos responsables de su transmisión entre plantas, incluidos algunos en las familias Cicadellidae, Cixiidae, Delphacidae, Derbidae y Psyllidae (Lee *et al.*, 2000, Weintraub y Beanland, 2006, Hogenhout *et al.*, 2008, Maejima *et al.*, 2014, Trivellone y Dietrich, 2021). El objetivo de este estudio fue detectar e identificar potenciales fitoplasmas asociados con los síntomas de hoja pequeña observados en *B. frutescens*.

Muestras de árboles sintomáticos de *B. frutescens* de localidades en la provincia de Cartago, Costa Rica (Cuadro 1) y de árboles sanos se recolectaron y evaluaron mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), y estudios moleculares

Cuadro 1. Localidades en la provincia de Cartago, Costa Rica, donde se observaron árboles de *Bocconia frutescens* con síntomas de hoja pequeña asociadas a fitoplasmas.

Localidad	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (m.s.n.m.)	Árboles sintomáticos evaluados / positivos ^z
Capellades	9° 55' 19.35"	83° 47' 28.31"	1622	9/9
Cervantes	9° 52' 54.99"	83° 49' 13.35"	1502	4/4
Cervantes	9° 52' 22.30"	83° 49' 48.42"	1502	2/2
Pacayas	9° 54' 42.24"	83° 48' 47.86"	1751	3/3
Juan Viñas	9° 54' 25.65"	83° 46' 44.95"	1398	0
La Verbena	9° 56' 36.82"	83° 41' 41.39"	1116	0
Chirraca	9° 54' 05.26"	83° 42' 15.87"	937	0
Guayabo	9° 58' 12.20"	83° 41' 22.65"	1116	0

^zAnalizados mediante PCR anidada, una muestra por árbol evaluada en dos diferentes ocasiones.

(PCR anidada y semianidada, clonaje y secuenciamiento, RFLPs *in silico* y análisis filogenéticos).

Muestras foliares de 18 árboles de *B. frutescens* con síntomas de hoja pequeña se recolectaron y evaluaron en dos diferentes ocasiones en época lluviosa, en las localidades de Capellades ($n=9$), Cervantes ($n=6$) y Pacayas ($n=3$), y de dos árboles sanos de *B. frutescens* en San Pedro de Montes de Oca (provincia de San José, 9°56'27.11"N/ 84°02'34.73"O, 1236 m.s.n.m.). Secciones de vena media (1-2 mm largo) de un árbol sintomático de Pacayas y otro de Cervantes, y uno sano (San Pedro) se fijaron y procesaron para MET. La fijación (toda la noche a 15 °C) se realizó con solución de Karnovsky (amortiguado con cacodilato al 0.05 M), posterior a lavados (amortiguador de cacodilato 0.05 M) se postfijó con tetraóxido de osmio (1 %). La deshidratación se hizo empleando una serie de etanol / óxido de propileno, y para la embebida se empleó este óxido y resina epóxica (dureza media de Spurr), finalmente se polimerizó con calor. Las secciones ultrafinas se obtuvieron de tres diferentes bloques por cada árbol muestreado. Las secciones con doble tinción se observaron a 100kV en un microscopio electrónico Hitachi TEM H-7100.

El ADN se extrajo de las venas medias usando el Mini Kit DNeasy Plant (Qiagen, Valencia, CA, USA) de las muestras de dos árboles de *Bocconia* sanos, de 18 con los síntomas hoja pequeña, y de un control positivo de *Sechium edule* infectado con fitoplasmas del 16SrI-B (Villalobos *et al.*, 2002). Las reacciones de PCR anidada se hicieron con los pares de iniciadores universales para fitoplasmas P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) en la primera ronda, y los iniciadores específicos R16F2n/ R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) para la segunda ronda. La mezcla de reacción de 25 µL para la PCR contenía DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), 0.4 uM de cada iniciador y 2 µL del ADN. El producto de la primera ronda se diluyó 1/40 para emplearse en la segunda.

Los perfiles empleados se muestran en el Cuadro 2 y éstos se corrieron empleando un termociclador “PCR Gradient Palm Cycler” (Corbett Research Model CG1-96, Australia). Los productos de las PCR anidadas se evaluaron mediante electroforesis (agarosa 1 % y tinción con GelRed).

Seis amplicones de la PCR anidada seleccionados aleatoriamente, dos por localidad de recolección de las muestras, se purificaron y secuenciaron (MacroGen Inc., Korea) directamente en ambas direcciones empleando los iniciadores R16F2n / R16R2. La secuencia ensamblada (“contig”) para cada muestra se obtuvo usando BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) y se compararon e identificaron mediante el algoritmo BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Una muestra de la localidad de Cervantes (código 16.1266) se seleccionó para la posterior caracterización de los fitoplasmas asociados con los síntomas de hoja pequeña. Un segundo producto de amplificación, con mayor tamaño, del gen ARNr 16S se obtuvo mediante una PCR semianidada usando los pares de iniciadores

Cuadro 2. Datos sobre los oligonucleótidos (iniciadores) y perfiles térmicos empleados en este estudio para la detección de fitoplasmas mediante los genes ARNr 16S y la translocasa *secA*.

Nombre del iniciador (publicación)	Secuencia del oligonucleótido sequece (5'→3') (referencia)	Par de iniciadores (tamaño esperado del amplicón), perfil térmico (referencia)
P1 (ARNr 16S)	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT (Deng y Hiruki, 1991)	
P7 (ARNr 23S)	CGTCCTTCATCGGCTCTT (Schneider <i>et al.</i> , 1995)	P1/P7 (1800 pb) y R16F2n/R16R2 (1200 pb)
R16F2n (ARNr 16S)	GAAACGACTGCTAAGACTGG (Gundersen y Lee, 1996)	94 °C por 2 min, 30 ciclos de (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min), 72 °C por 10 min (Villalobos <i>et al.</i> , 2019).
R16R2 (ARNr 16S)	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG (Gundersen y Lee, 1996)	
P1A (ARNr 16S)	AACGCTGGCGGCGCCTAATAC (Lee <i>et al.</i> , 2004)	P1/16S-SR (1500 pb) y P1A/16S-SR (1200 pb)
16S-SR (ARNr 16S)	GGTCTGTCAAACTGAAGATG (Lee <i>et al.</i> , 2004)	94 °C por 2 min, 38 ciclos de (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min), 72 °C por 10 min (Villalobos <i>et al.</i> , 2011).
SecAfor1 (gen <i>secA</i>)	GARATGAAAAGTGGGAAGG Hodgets <i>et al.</i> (2008)	SecAfor1/SecArev3 (840 pb) y SecAfor2/SecArev3 (480 pb)
SecArev3 (gen <i>secA</i>)	GTTTTTRGCAGTTCCTGTCATNCC Hodgets <i>et al.</i> (2008)	94 °C por 2 min, 35 ciclos de (94 °C por 30 s, 53 °C por 60 s y 72 °C por 90 s), 72 °C por 15 min (Hodgets <i>et al.</i> , 2008).
SecAfor2 (gen <i>secA</i>)	GAYGARGSWAGAACKCC Hodgets <i>et al.</i> (2008)	

P1/16S-SR y P1A/16S-SR (Deng y Hiruki, 1991; Lee *et al.*, 2004). La mezcla de reacción empleada fue la mencionada previamente. El producto de la primera ronda de PCR se diluyó 1/40 previo al uso en la PCR semianidada. Los perfiles térmicos usados se muestran en el Cuadro 2. El amplicón se clonó (sistema TA) y tres colonias bacterianas se secuenciaron en ambas direcciones (Macrogen Inc., Korea). La herramienta VecScreen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>) se usó para identificar y remover las secuencias del vector de clonación. Se ensambló una secuencia por clon (total=3), todas las secuencias ensambladas mostraron 100 % de identidad entre ellas. La secuencia final de 1.5 Kpb (disponible en el GenBank PP353584) se empleó para la búsqueda de similitud (BLASTn) y también se analizó mediante RFLPs virtuales en la plataforma *iPhyClassifier* (Zhao *et al.*, 2009) disponible en <https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>.

Adicionalmente, esta secuencia del 16Sr del fitoplasma asociado a los síntomas de hoja pequeña se alineó (ClustalW) con 29 razas del grupo 16SrIII, siete especies de '*Ca. Phytoplasma*', y una de *Acholeplasma laidlawi* (M23932); los análisis evolutivos se realizaron con MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), usando el método de Máxima Parsimonia y un "bootstrap" de 1000 repeticiones. Además, las 13 regiones únicas de secuencias de oligonucleótidos (UOSRs, por sus siglas en inglés) en la secuencia del 16Sr de '*Ca. Phytoplasma pruni*' (JQ044393) se compararon usando ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), con la secuencia parcial del 16Sr obtenida (PP353584).

Una secuencia parcial para el gen no ribosomal *secA* también se obtuvo para la muestra 16.1266, como un segundo código de barras de ADN ("DNA barcode") para la identificación del fitoplasma asociado a los síntomas mencionados. La PCR semianidada se hizo empleando los pares de iniciadores SecAfor1/SecArev3 y SecAfor2/SecArev3, de acuerdo a Hodgets *et al.* (2008). La mezcla de la reacción usada fue la mencionada previamente, pero el producto de la primera ronda se diluyó 1/20 antes de usarse en la PCR semianidada. Los perfiles térmicos empleados se muestran en el Cuadro 2. El amplicón se envió a Macrogen Inc. (Korea), se secuenció directamente y en ambos sentidos con el par de iniciadores usados en la ronda semianidada. La secuencia parcial obtenida (457 nt, GenBank No. Acc. PP375806) se comparó con secuencias de otros fitoplasmas usando el algoritmo BLASTn en GenBank. Además, ésta se alineó (ClustalW) con secuencias de *secA* de diez razas del grupo 16SrIII, siete especies de '*Ca. Phytoplasma*', y una raza de *Bacillus subtilis* (D10279) para realizar un análisis evolutivo en MEGA X, usando el método de Máxima Parsimonia y un "bootstrap" de 1000 repeticiones.

Árboles de *Bocconia frutescens* mostraron aglomeraciones (racimos) de hojas pequeñas en ramas (Figura 1A), brotaciones axilares múltiples o "escobas de bruja" ("witches'-broom") con hojas pequeñas en el tronco (Figura 1C), defoliación y muerte descendente (Figura 1B), se observaron en áreas de sucesión secundaria,



Figura 1. Árboles de *Bocconia frutescens* (Papaveraceae) con síntomas asociados a fitoplasmas observados en la provincia de Cartago, Costa Rica; **A)** “escobas de bruja” (“witches’-broom”) y racimos de hojas pequeñas observados en algunas ramas; **B)** “Escoba de bruja”, defoliación y muerte descendente; **C)** Detalle de la brotación axilar múltiple con hojas de reducido tamaño.

bordes de caminos, orillas de ríos y riachuelos, en varias localidades en la provincia de Cartago. Adicionalmente, árboles sintomáticos aislados en bordes de caminos se observaron cerca de la ciudad de Turrialba (Cuadro 1). Los síntomas se presentan en algunas ramas de los árboles enfermos. No se detectaron diferencias en los síntomas presentados por los árboles en las diferentes localidades. Para esta sintomatología proponemos el nombre de hoja pequeña de *Bocconia frutescens* (BfLL, por su sigla en inglés).

Todos los resultados confirmaron la presencia de fitoplasmas asociados a árboles de *Bocconia* con síntomas de hoja pequeña y escoba de bruja. Estructuras pleomórficas, desprovistas de pared celular, semejantes a fitoplasmas se observaron

al MET solamente en el tejido del floema de los árboles sintomáticos de *Bocconia* (Figura 2A). En el tejido del floema de los árboles sanos de *Bocconia* no se observó ninguna estructura semejante a fitoplasmas u otras bacterias. La electroforesis en gel de las PCR anidadas (P1/P7, R16F2n/R2) mostraron fragmentos cercanos a 1.2 Kb en todas las muestras sintomáticas ($n=18$) y del control positivo, y ninguna amplificación de los árboles sanos y de la mezcla de control para la PCR (agua sustituyendo el ADN). Las secuencias obtenidas del ARNr 16S (*ca.* 1200 nt) de seis amplicones mostraron 100 % de similitud entre ellas. Las secuencias resultantes indicaron que el fitoplasma en *B. frutescens* se relaciona a diferentes razas del grupo 16SrIII, y por tanto es una raza relacionada a '*Ca. Phytoplasma pruni*' (JQ044393, Davis *et al.*, 2013). Las secuencias del 16S de BfLL mostraron un alto porcentaje de similitud en el GenBank con "Mexican Xalapa periwinkle virescence phytoplasma" (99.67 %, KY778008-09), '*Ca. Phytoplasma pruni*' (99.50 %, MH428959), y "Milkweed yellows phytoplasma" (99.48 %, AF510724).

De acuerdo a los resultados del *iPhyClassifier*, la secuencia parcial del 16Sr de 1.5 Kbp (muestra 16.1266, PP353584) mostró similitud de 98.87 % con el '*Ca.*

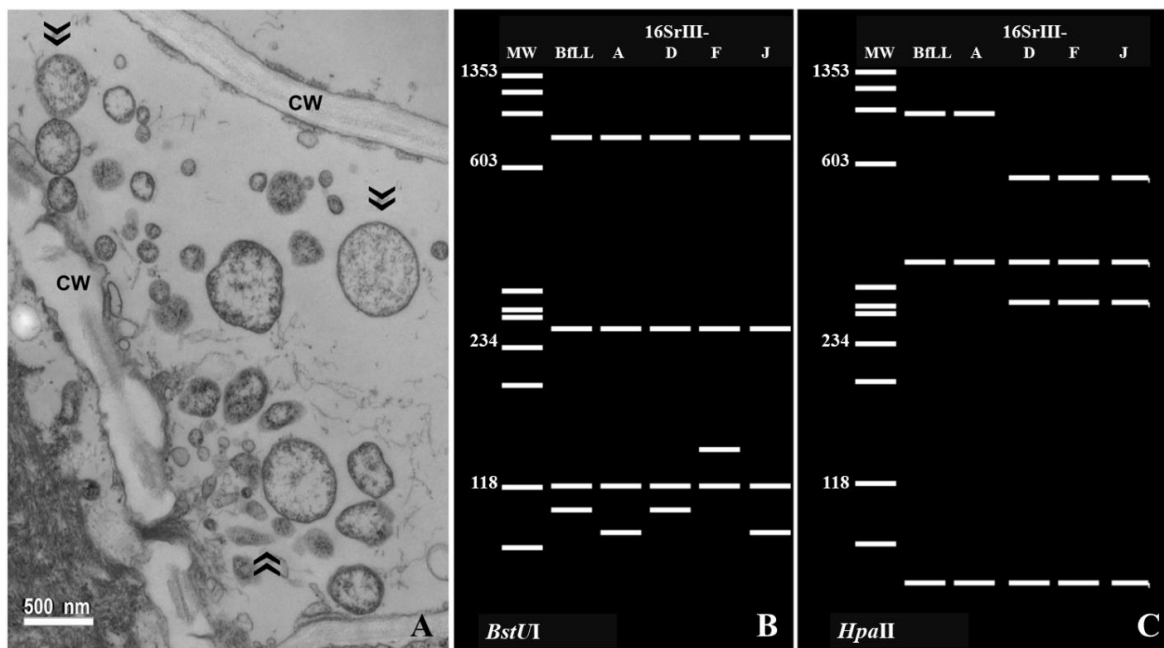


Figura 2. A) Cuerpos pleomórficos de fitoplasmas (») encontrados en el floema de árboles de *Bocconia frutescens* con síntomas de hoja pequeña y "escobas de bruja", observados en la provincia de Cartago, Costa Rica. CW = pared celular; B y C) Perfiles de los RFLPs virtuales obtenidos en el *iPhyClassifier* del fragmento 16Sr F2/R2n del fitoplasma asociado a la hoja pequeña en *B. frutescens* (BfLL, GenBank Acc. No. PP353584) usando *Bst*UI (C) y *Hpa*II. (D). Fragmentos (pb) del marcador de peso molecular (MW): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72.

Phytoplasma pruni' (JQ044393). Por tanto, el fitoplasma infectando *B. frutescences* en la provincia de Cartago (Costa Rica) es un miembro de 'Ca. Phytoplasma pruni' (Davis *et al.*, 2013), esto por el umbral de similitud ("similarity threshold") para el gen ARNr 16S indicado en la nueva guía para la delimitación de especies de 'Ca. Phytoplasma' (Bertaccini *et al.*, 2022, IRPCM 2004). Además, los resultados indicaron que la secuencia es diferente de los patrones de referencia de los subgrupos para 16SrIII establecidos previamente. El patrón de referencia con mayor similitud fue el 16SrIII-F (AF510724), con un coeficiente de 0.95, sugiriendo que el fitoplasma asociado a BfLL podría representar un nuevo subgrupo del 16SrIII. Los RFLPs simulados mostraron patrones virtuales que no corresponden al subgrupo 16SrIII-F empleando las enzimas *Bst*UI y *Hpa*II. El patrón virtual obtenido con *Bst*UI corresponde al 16SrIII-D, mientras que el perfil para *Hpa*II corresponde a los subgrupos 16SrIII- A, G, L y S (Figura 2B y 2C).

La secuencia 5'CAAGACTATGATGTGTAGCTGGACT3', informada como la característica para 'Ca. Phytoplasma pruni' (posiciones 258-282, JQ044393, Davis *et al.*, 2013), es idéntica a la cepa encontrada en *Bocconia* (posiciones 237-261, PP353584). Al comparar las 13 UOSRs de 'Ca. Phytoplasma pruni', reportadas por Davis *et al.* (2013), con las de la secuencia parcial 16Sr de BfLL (PP353584), se observa que siete de las 13 UOSRs corresponden a BfLL. Adicionalmente, se presentaron polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en otros cinco UOSRs, y un dinucleótido polimórfico en el UOSR entre las posiciones 817 y 828 (JQ044393) (Cuadro 3).

El dendrograma resultante del análisis filogenético para las secuencias parciales del gen ARNr 16S de 37 fitoplasmas (Figura 3) mostró que el detectado en *B. frutescens* conglobera con otras del grupo 16SrIII (soporte de 99 %). El fitoplasma del BfLL agrupó con una cepa variante del 16SrIII-F, previamente encontrada infectando *C. roseus* en Costa Rica (MH428959, Villalobos *et al.* 2019) y otra de Xalapa (México) (KY778008-09, Pérez-López *et al.* 2017). El grupo más cercano a éste, contiene cepas representantes de los subgrupos 16SrIII-F, C, D, M y N (AF510724, FJ376627, FJ376626, FJ376629, FJ226074, respectivamente).

La secuencia parcial obtenida para la *secA* del fitoplasma asociado a BfLL (PP375806) presenta una similitud de 94.97-97.81 % (valor $e = 0$) con diferentes razas de la enfermedad X ('Ca. Phytoplasma pruni') disponibles en el GenBank. Adicionalmente, los análisis filogenéticos usando las secuencias parciales para el gen *secA* (Figura 4) posicionaron al fitoplasma asociado a BfLL, más relacionado con las secuencias *secA* de otros representantes de los subgrupos D y F del 16SrIII.

Pérez-López *et al.* (2017) sugirieron que la raza Xalapa (KY778008) es un linaje norteamericano para el subgrupo del 16SrIII-J presente en Sur América. Sin embargo, de acuerdo con las relaciones filogenéticas que se obtuvieron (Figura 4), las razas encontradas en Costa Rica (PP353584 y MH428959) y Xalapa (KY778008)

Cuadro 3. Regiones únicas de secuencias de oligonucleótidos (UOSRs, por sus siglas en inglés) en el gen ARNr 16S del ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’ rrnA (JQ044393, Davis *et al.*, 2013) comparado a la secuencia 16Sr del fitoplasma asociado a BfLL (PP353584). La posición en la secuencia respectiva se muestra entre paréntesis, cada nucleótido correspondiente a un SNP se indica en los colores estándar para los nucleótidos del ADN, además se resalta y subraya.

‘ <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ’ rrnA (JQ044393), Davis <i>et al.</i> (2013)	Fitoplasma asociado a hoja pequeña de <i>Bocconia frutescens</i> (PP353584)
5'-CACATTAGTTAGTTGG I AGGGTAAAGGCCTA CC-3' (226 a 258)	C (221)
5'-GTACCTCGGTATG-3' (402 a 414)	idem (381-393)
5'-TTATTAAGGAAGAAAAAGAGTGGAAAAAC TCCCT-3' (425 a 459)	idem (404-438)
5'-ACGGTACTTAA-3' (462 a 472)	idem (441-451)
5'-TAATAAGTCTATAGTTTAAATTCAG I GCTTA ACGCT GTTGTGCTATAG-3' (571 a 618)	C (575)
5'-GTTTTACTAGAGTGAG-3' (624 a 639)	idem (603-618)
5'-TAAAA C I G GTAC-3' (817 a 828)	AC (801-802)
5'-TTTCTTGCGAAGTTA-3' (970 a 984)	idem (949-963)
5'-ATGGAGGT C ATCAGGAAAAACAGGTG GTGC-3' (995 a 1023)	I (982)
5'-CTTGTCGTTA G TTGCCAGCATGTAAT-3' (1083 a 1108)	A (1072)
5'-GATGGGGACTTTAACGA-3' (1109 a 1125)	idem (1088-1104)
5'-GGTTGATACAAAG-3' (1211 a 1223)	idem (1190-1202)
5'-TCTCA A AAAATCAATC-3' (1252 a 1267)	C (1236)

podrían representar un potencial nuevo linaje geográfico y, a la vez, potenciales nuevos subgrupos del 16SrIII, reportados en Centroamérica y México. Adicionalmente, en Costa Rica se reportó una raza del 16SrIII-L asociada a la enfermedad del “cuero de sapo” de la yuca (Pardo *et al.*, 2014). También, otro representante del grupo 16SrIII se reportó infectando *Spondias purpurea* en El Salvador (Parada *et al.*, 2006). Estos hallazgos sugieren que diferentes razas del grupo 16SrIII pueden estar dispersos en la región de Centroamérica, representando un riesgo para la agricultura y los ecosistemas naturales.

El grupo 16SrIII de los fitoplasmas es altamente diverso, tiene una amplia distribución geográfica y gran número de subgrupos asociados a una alta diversidad de especies vegetales hospederas (Zhao *et al.*, 2009, Pérez-López *et al.*, 2017). De acuerdo con Bertaccini *et al.* (2022), 203 razas muestran identidades nucleotídicas de 98.80-100 % al compararse a la raza de referencia descrita para ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’. Este es el número más alto de razas reportadas para una de las 49 especies de ‘*Ca. Phytoplasma*’ aceptadas oficialmente. Las enfermedades asociadas con este grupo de fitoplasmas han sido informadas en diferentes países en Europa, Asia, América y África (Foissac y Wilson, 2009). En las Américas, el número de reportes para Suramérica es particularmente alto (Fiore, 2023; Pérez-López *et al.*, 2016).

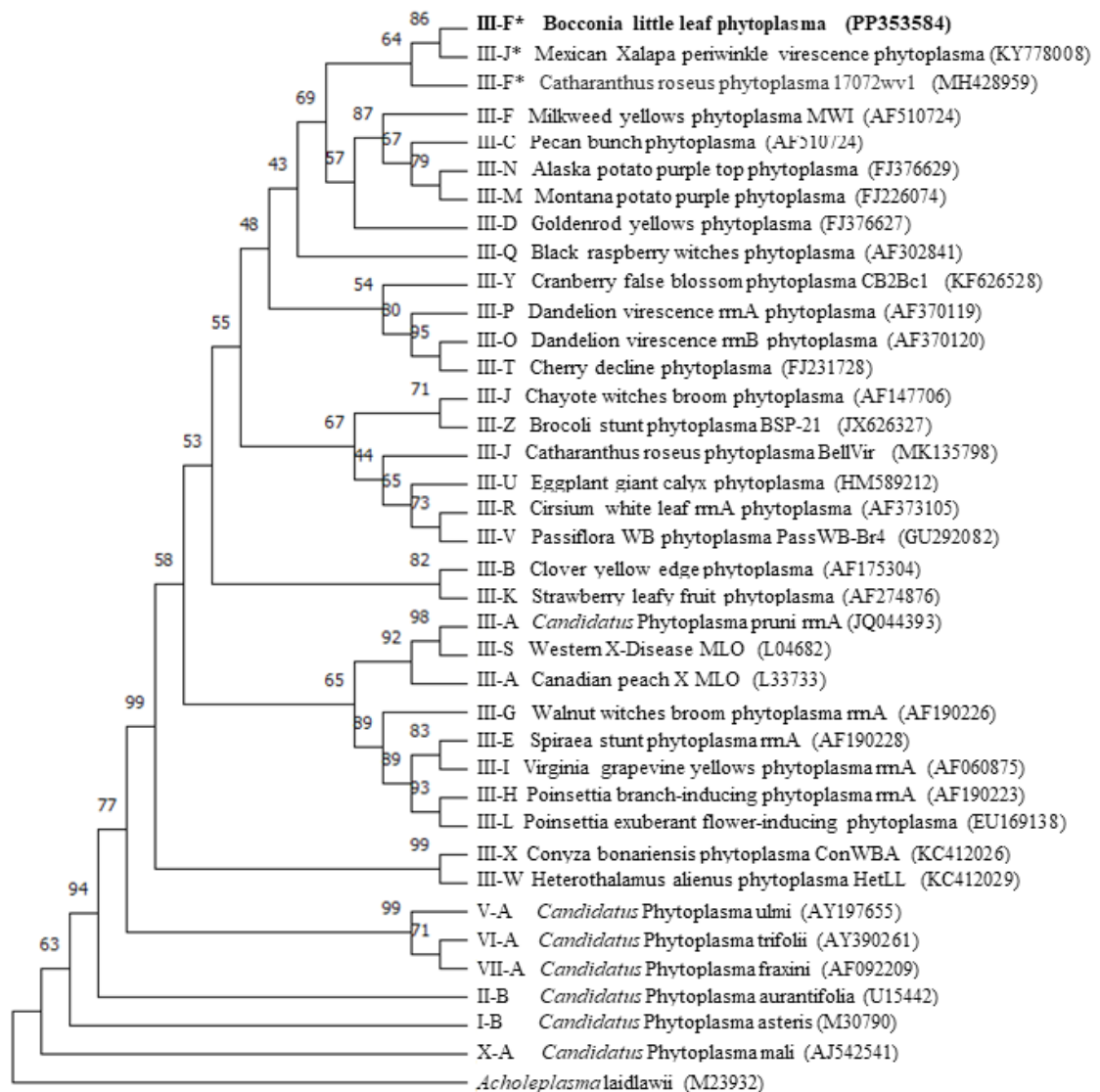


Figura 3. Dendrograma obtenido del análisis filogenético usando el método de Máxima Parsimonia en las secuencias parciales ARNr 16S del fitoplasma asociado a hoja pequeña de *Bocconia frutescens* (BfLL), 29 secuencias de razas del grupo 16SrIII, siete especies de ‘*Ca. Phytoplasma*’ y *Acholeplasma laidlawii* como grupo externo. El “bootstrap” seleccionado para la prueba fue de 1000 repeticiones. Los números de acceso en el GenBank para cada secuencia se muestran en paréntesis. El fitoplasma asociado a BfLL se resalta en negrita. * = nuevos subgrupos tentativamente.

Para nuestro conocimiento, este es el primer informe de la ocurrencia natural de una raza relacionada al ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ en *Bocconia frutescens* (Papaveraceae) en Costa Rica o en el mundo.

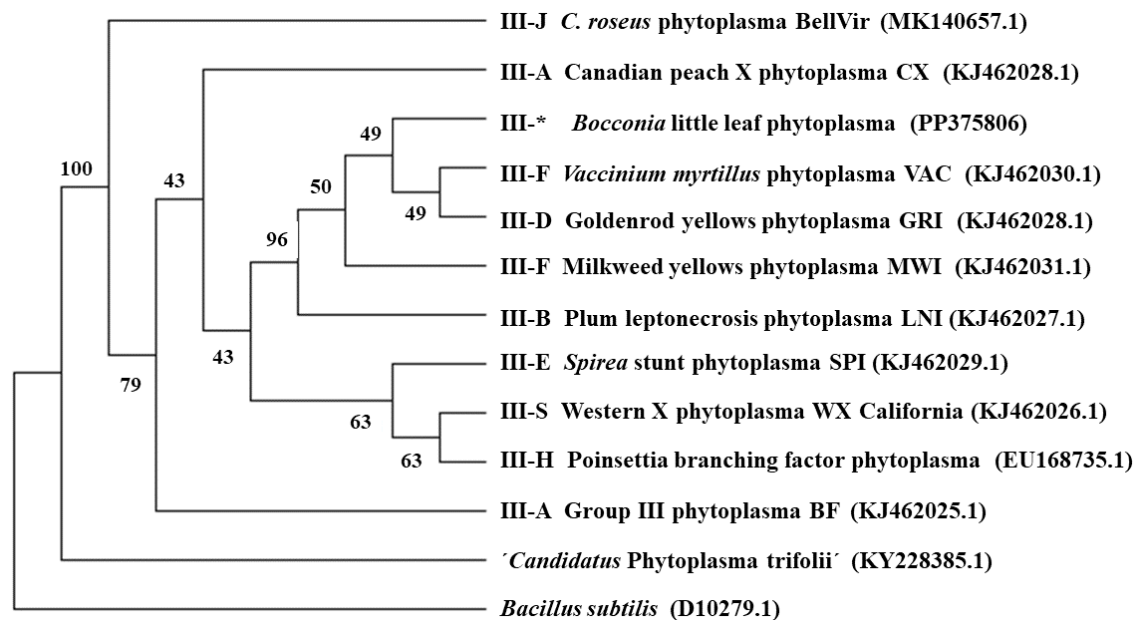


Figure 4. Dendrograma obtenido mediante el análisis filogenético con Máxima Parsimonia usando las secuencias parciales del gen *secA* del fitoplasma asociado a hoja pequeña de la *Bocconia frutescens*, diez secuencias de *secA* de diferentes subgrupos 16SrIII, ‘*Ca. Phytoplasma trifolii*’ y *Bacillus subtilis* (grupo externo). El “bootstrap” seleccionado fue de 1000 repeticiones. Los números de registro en GenBank para cada secuencia se muestran entre paréntesis. * = tentativamente nuevo subgrupo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Costa Rica por los aportes para esta investigación (Proyecto B3126 y Actividad de Investigación A1801).

LITERATURA CITADA

- Bertaccini A, Arocha-Rosete Y, Contaldo N, Duduk B, Fiore N, Montano HG, Kube M, Kuo Ch-H, Martini M, Oshima K, Quaglino F, Schneider B, Wei W and Zamorano A. 2022. Revision of the ‘*Candidatus Phytoplasma*’ species description guidelines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 72:005353. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005353>
- Boucher S and Nishida K. 2014 Description and biology of two new species of Neotropical *Liriomyza* Mik (Diptera, Agromyzidae), mining leaves of *Bocconia* (Papaveraceae). *ZooKeys* 369: 79-97. <https://doi.org/10.3897/zookeys.369.6168>
- Davis RE, Zhao Y, Dally EL, Lee M, Jomantiene R and Douglas SM. 2013. ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’, a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, *secY*, and ribosomal protein genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:766-776. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.041202-0>
- Deng S, Hiruki D. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14:53-61. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-D](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D)
- Fiore N. 2023. Main phytoplasmas infecting crops in South America. *Phytopathogenic Mollicutes* 13(1): 119-120. <https://doi.org/10.5958/2249-4677.2023.00060.9>

- Francis JK. 2004. *Bocconia frutescens* L. Pp 115-116. In: JK Francis (ed.) Wildland shrubs of the United States and its territories: Thamnisc descriptions: Vol. 1. Gen. Tech. Rep. IITF-GTR-26, 1. San Juan, Puerto Rico: US Department of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry, and Fort Collins, CO: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. https://www.fs.fed.us/rm/pubs_series/iitf/iitf_gtr026.pdf. (accessed August 10th, 2021).
- Foissac X and Wilson MR. 2009. Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. Pp309-324. In: PG Weintraub & P Jones (eds) Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors. CABI UK. <https://doi.org/10.1079/9781845935306.0000>
- Gundersen DE and Lee IM. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal initiator pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144-151. <http://www.jstor.org/stable/42685262>
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series (Oxford)* 41: 95-98. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29
- Hodgetts J, Boonham N, Mumford R, Harrison N and Dickinson M. 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of '*Candidatus* Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58(8): 1826-1837. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65668-0>
- Hogenhout SA, Oshima K, Ammar ED, Kakizawa S, Kingdom HN and Namba S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9: 403-423. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00472.x>
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group. 2004. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1243-1255. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02854-0>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology Evolution* 35:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lee IM, Davis RE and Gundersen-Rindal DE. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.221>
- Lee, IM, Martini M, Marcone C and Zhu SF. 2004. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus* Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 337-347. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02697-0>
- Lunagómez L, Santiago-Roque I, Gheno-Heredia Y, Corona-Morales A and Bolado-García V. 2020. Teratogenic effects of *Bocconia frutescens* L. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 11: 415-418. <https://doi.org/10.1017/S2040174419000461>
- Maejima K, Oshima K and Namba S. 2014. Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *Journal general of Plant Pathology* 80: 210-221. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0512-8>
- Parada RY, Castro S, Serrano R, Castillo BE, Vides E, Ayala J and Romero J. 2006. First report of a phytoplasma associated with *Spondias purpurea* (Jocote de Corona) in El Salvador. *Journal general of Plant Pathology* 72:40-42. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0241-0>
- Pardo JM, Truke MJ, Cardozo L, Varela I and Alvarez E. 2014. A real time PCR assay to detect and quantify 16SrIII-L and 16SrI phytoplasmas associated with cassava frogskin in Costa Rica and Paraguay. *Phytopathology* 105: S1.3. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-105-3-S1.1>
- Pérez-López E, Luna-Rodríguez M, Olivier CY and Dumonceaux TJ. 2016. The underestimated diversity of phytoplasmas in Latin America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 492-513. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000726>
- Pérez-López E, Wei W, Wang J, Davis RE, Luna-Rodríguez M and Zhao Y. 2017. Novel phytoplasma strains of X-disease group unveil genetic markers that distinguish North American and South American geographic lineages within subgroups 16SrIII-J and 16SrIII-U. *Annals of Applied Biologists* 171: 405-416. <https://doi.org/10.1111/aab.12383>
- Schneider B, Seemuller E, Smart CD and Kirkpatrick BC. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. Pp. 369-380. In: Razin S and Tully JG (Eds). *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, Vol. 1. Academic Press, San Diego, CA, USA. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=0a31b4197da6cc57823dbb2d1265614e1557c152>

- Sherley G. 2000. Invasive species in the Pacific: a technical review and draft regional strategy. South Pacific Regional Environment Programme. 197p. http://www.issg.org/cii/Electronic%20references/pii/references/sherley_invasivespecies_in_the_pacific_a_technical_review_and_draft_regiona_strategy.pdf. (accessed July 10th, 2019)
- Soto A. 2007. Papaveraceae. Pp 859-861. *In*: Hammel BE, Grayum MH, Herrera C, Zamora N (Eds). Manual de Plantas de Costa Rica, Vol VI, Dicotiledóneas (Haloragaceae - Phytolaccaceae). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, St. Louis 111: 1-933. ISBN 978-1-930723-60-3
- Tassin J, Rivière J, Cazanove M and Bruzzese E. 2006. Ranking of invasive woody plant species for management on Réunion Island. *Weed Research* 46: 388-403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2006.00522.x>
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Trivellone V and Dietrich CH. 2021. Evolutionary diversification in insect vector - phytoplasma - plant associations. *Annals of Entomological Society of America* 114: 137-150. <https://doi.org/10.1093/aesa/saaa048>
- Villalobos W, Moreira L, Bottner KD, Lee IM and Rivera C. 2002. First report of an Aster yellows subgroup 16SrI-B phytoplasma infecting chayote in Costa Rica. *Plant Disease* 86: 330C. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.3.330C>
- Villalobos W, Martini M, Garita L, Muñoz M, Osler R and Moreira L. 2011. *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae), a New Natural Host of 16SrXV Phytoplasma in Costa Rica. *Tropical Plant Pathology* 36: 110-115. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000200007>
- Villalobos W, Bottner-Parker K, Albertazzi-Castro FJ, Montero-Astúa M, Sandoval I, Garita L and Moreira L. 2019. *Catharanthus roseus* naturally infected with diverse phytoplasmas in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 67: 321-336. <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i1.33972>
- Weintraub PG and Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51:91-111. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>
- Zhao Y, Wei W, Lee IM, Shao J, Suo X and Davis RE. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:2582-2593. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.010249-0>