



Artículo Científico

Identificación de fitoplasmas asociados al Bunchy Top de la papaya en Colima, México

Pedro Valadez-Ramírez, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez*, Guadalupe Valdovinos-Ponce, Edith Blanco-Rodríguez, Sergio Aranda-Ocampo, Candelario Ortega-Acosta, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56264, **Marco Tulio Buenrostro-Nava, Jetzajary Ayerim Rodríguez-Barajas, Luis Rafael De la Torre-Velázquez, Carlos Luis Leopardi-Verde**, Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Autopista Colima-Manzanillo km 40, Tecoman, Colima, México, CP 28930.

RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. Fitoplasmas, rickettsias y virus se han detectado en plantas de papaya con la enfermedad Bunchy Top (BT). En agroecosistemas de papaya ubicados en Colima, México, durante 2019 se observaron plantas con síntomas similares al BT. Con la finalidad de determinar la presencia de fitoplasmas e identificar las especies y/o subgrupos asociados a esta enfermedad, se recolectaron plantas asintomáticas y con síntomas en cuatro municipios productores del estado, así como malezas e insectos asociados al cultivo.

Materiales y Métodos. La detección e identificación de fitoplasmas se hizo a través de PCR, secuenciación y análisis filogenéticos de la subunidad SecA de la translocasa (*secA*) y 16S RNA ribosomal (*16Sr*), y PCR-RFLPs *in vitro* e *in silico* del gen *16Sr*.

Resultados. En papaya se identificaron fitoplasmas de los grupos 16SrI (subgrupo AF), 16SrX y 16SrXIII, en el 2.08% (4 de 192) de las muestras con síntomas. Los resultados del análisis RFLPs *in silico* del gen *16Sr* mostraron la presencia de los (sub)grupos 16SrX y 16SrXIII. En malezas e insectos, se identificaron fitoplasmas del grupo 16SrI (subgrupos AF y B) en el 1.7% (3 de 174) y 1.1% (2 de 185) de las muestras analizadas, respectivamente. Las malezas portadoras de fitoplasmas fueron *Amaranthus palmeri* y *Echinochloa colona*, mientras que los insectos fueron *Microtalis calva* y *Balclutha mexicana*.

*Autor de
correspondencia:
Daniel Leobardo
Ochoa-Martínez
ldaniel@colpos.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
05 Marzo, 2024

Aceptado:
19 Mayo, 2024

Publicado:
18 Junio, 2024

Cita:
Valadez-Ramírez P,
Ochoa-Martínez DL,
Valdovinos-Ponce G,
Blanco-Rodríguez E *et al.*,
2024. Identificación de
fitoplasmas asociados al
Bunchy Top de la papaya
en Colima, México.
Revista Mexicana de Fito-
patología 42(3): 24.
[https://doi.org/10.18781/R.
MEX.FIT.2403-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2403-2)



Conclusión. Se reporta por primera vez la presencia de fitoplasmas 16SrI-AF, 16SrX y 16SrXIII en plantas de papaya con síntomas de Bunchy Top en agroecosistemas del estado de Colima, México. Los fitoplasmas de los grupos 16SrX y 16SrXIII se registran por primera vez a nivel mundial y en México en papaya, respectivamente. Las malezas e insectos portadores de fitoplasmas constituyen nuevos registros como reservorios naturales y potenciales vectores de las bacterias.

Palabras clave: *Carica papaya*, ‘*Candidatus Phytoplasma*’, malezas, insectos

INTRODUCCIÓN

México es el tercer productor de papaya (*Carica papaya*) en el mundo y principal proveedor de fruta fresca a Estados Unidos de América y Canadá, donde las ventas anuales superan las 350 000 toneladas, con un valor de 335 millones de dólares (SIAP, 2020). En este país la producción de la caricácea está localizada en las regiones Sur-Sureste y Centro Occidente, siendo Oaxaca, Colima y Chiapas los principales estados productores (SIAP, 2020). El estado de Colima, ubicado en la región Occidente por la costa sur del Océano Pacífico, posee un registro de producción de 192 417 toneladas y es el principal exportador nacional (Consejo de Productores de Papaya del estado de Colima [COEPAPAYA A.C.], 2017; SIAP, 2020).

En 2019, en 64 agroecosistemas de papaya visitados en cuatro municipios del estado de Colima, se observaron plantas con acortamiento de entrenudos que originaban el arrepollamiento de las hojas apicales. Estas plantas también presentaron hojas con clorosis, amarillamiento, deformación y/o necrosis marginal. Estos síntomas son típicos de la enfermedad Bunchy Top (BT) (Cook, 1931; Story y Halliwell, 1969), y semejantes a los descritos en Cuba como síndromes “*papaya bunchy top*” (PBT) y “*bunchy top symptom*” (BTS) (Acosta *et al.*, 2013).

El BT es inducido por fitoplasmas, rickettsias y virus, a veces en infecciones mezcladas (fitoplasmas + rickettsias o fitoplasmas + virus), y se ha reportado en República Dominicana, Cuba, Haití, Jamaica, Puerto Rico, Costa Rica, Perú (Martorell y Adsuar, 1952; Story y Halliwell, 1969; Davis *et al.*, 1998; Arocha *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2013; Luis-Pantoja *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2017) y más recientemente en Nigeria (Kazeem *et al.*, 2021).

Considerando que en México se han detectado fitoplasmas en plantas de papaya con síntomas parecidos al BT (Pogoshyan *et al.*, 2004; Navarrete-Yabur *et al.*, 2005; Rojas-Martínez *et al.*, 2011), y que en Colima, esta enfermedad ha adquirido mayor importancia económica y su estudio se ha abordado escasamente (productores de papaya del estado de Colima, comunicación personal); se han planteado los siguientes objetivos: a) determinar la presencia de fitoplasmas en plantas de papaya

con síntomas de BT, así como en malezas e insectos asociados al cultivo, y b) establecer la identidad a nivel grupo y/o subgrupo 16Sr.

En noviembre y diciembre de 2019, se recolectaron 256 muestras de papaya en 64 agroecosistemas comerciales localizados en los municipios de Tecmán, Colima, Ixtlahuacán y Armería. Del total de muestras, 64 fueron asintomáticas y 192 presentaron síntomas relacionados con BT. De cada planta se obtuvo una muestra compuesta constituida por tres hojas (lámina y pecíolo), cada una de las cuales se recolectó de los estratos superior, medio e inferior de la planta. De cada planta de papaya (sintomática o asintomática muestreada) se recolectaron (de acuerdo con su disponibilidad y mayor abundancia) hasta cinco especies de malezas presentes en un diámetro de 2 m. Asimismo, se colectaron insectos con una red entomológica de golpeo con tres barridos, de arriba y abajo, sobre la planta de papaya y malezas adyacentes. Los insectos se conservaron en etanol al 96 % para su posterior clasificación en morfoespecies. Las malezas e insectos que fueron positivos para fitoplasmas se identificaron a nivel especie.

A partir de nervaduras centrales y de pecíolos de hojas de papaya y malezas, así como ejemplares completos de insectos (uno a cinco, según tamaño y disponibilidad), se extrajo el ADN total con un protocolo de enriquecimiento con ADN de fitoplasma basado en CTAB (Ahrens y Seemuller, 1992) y con ayuda de un homogeneizador (Tissue Lyser, Qiagen, Alemania) (Stillson y Szendrei, 2020). El ADN se evaluó por espectrofotometría de luz UV (NadoDrop 2000, Fisher Scientific, EUA) y por amplificación por PCR del gen de la proteína ribosomal S16 (*rps16*) de plantas (Oxelman *et al.*, 1997) o citocromo oxidasa subunidad I (*COI*) de insectos (Folmer *et al.*, 1994), como controles internos en volúmenes de reacción de 25 µL con 50 ng de ADN.

La detección de fitoplasmas se realizó en 200 ng de ADN por PCR punto final anidada de los genes *16Sr* (primera ronda: iniciadores P1/P7 y anidada: iniciadores R16F2n/R16R2 y R16mF2/R16mR1) (Deng y Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995; Gundersen y Lee, 1996; Lee *et al.*, 1993) y *secA* (primera ronda: iniciadores secAFor1/secARev3 y anidada: iniciadores SecAFor5/SecARev2) (Dickinson y Hodgetts, 2013).

La identificación se hizo por secuenciación, PCR-RFLPs *in vitro* e *in silico* del gen *16Sr* y análisis filogenéticos de *secA* y *16Sr*. Para la secuenciación, los amplificones de la PCR anidada para *16Sr* (iniciadores R16mF2/R16mR1) y *secA* de las muestras positivas se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA) y se secuenciaron en ambos sentidos con los iniciadores R16mF2/R16mR1 y SecAFor5/SecARev2, con el método de dideoxi o cadena terminal en MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias resultantes se analizaron con el programa MEGAX (Kumar *et al.*, 2018) y la función BLASTn del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm>

nih.gov/Blast.cgi), para su depósito en el GenBank (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para las PCR-RFLPs *in vitro*, aproximadamente 1 µg de cada producto purificado de la PCR anidada para el gen *16Sr* (iniciadores R16F2n/R16R2) de las muestras positivas, cuantificado por espectrofotometría de luz UV (NanoDrop 2000, Fisher Scientific, EUA) se digirió, por separado, con 10 U de las enzimas de restricción *Taq* I, *Hae* III, *Sau* 3AI, *Kpn* I, *Tru* II (*Mse* I), *Alu* I y *Rsa* I (Thermo Scientific, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante, para confirmar que el fragmento amplificado correspondiera a ADN de fitoplasmas (Lee *et al.*, 1998). Los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa 3 % (p/v) en amortiguador TAE 1× y se tiñeron con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001).

Para los RFLPs *in silico*, las secuencias de los amplicones de la PCR anidada (iniciadores R16mF2/R16mR1), editadas manualmente con MEGAX (Kumar *et al.*, 2018), se analizaron con el software *iPhyClassifier* (<https://acortar.link/AikrtQ>) para la asignación y/o confirmación de especies, grupos y subgrupos 16Sr.

Los análisis filogenéticos se hicieron independientemente con los genes *secA* y *16Sr*. Para ello, secuencias de cada uno de los genes analizados de diferentes grupos de fitoplasmas reportados a nivel mundial (49 para *secA* y 51 para *16Sr*) y de *Bacillus subtilis* (GenBank: X62035 para *secA*) o de *Acholeplasma laidlawii* (GenBank: U14905 para *16Sr*) como grupos externos, se descargaron del GenBank y se alinearon con Clustal W. La construcción de las filogenias se realizó con el método de neighbor-joining con 1000 repeticiones de bootstrap. Todos los análisis se hicieron en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Los fitoplasmas se detectaron en el 2.08 % (4 de 192) de plantas de papaya con síntomas asociados al BT (Cuadro 1). No se detectaron fitoplasmas en plantas asintomáticas. Las plantas positivas se recolectaron en los municipios de Colima e Ixtlahuacán (Cuadro 1) y presentaron tallos con acortamientos de entrenudos y hojas amarillas y cloróticas (Figura 1A). Las muestras positivas se confirmaron

Cuadro 1. Detección de fitoplasmas en papaya (*Carica papaya*), malezas e insectos asociados a su cultivo en Colima, México, durante noviembre y diciembre de 2019.

Municipio	Número de muestras positivas a fitoplasmas / Número de muestras analizadas (%)		
	Papaya	Malezas	Insectos
Armería	0/64 (0.0)	1/74 (1.4)	1/60 (1.7)
Colima	2/64 (3.1)	0/31 (0.0)	0/32 (0.0)
Ixtlahuacán	2/64 (3.1)	1/35 (2.9)	0/46 (0.0)
Tecomán	0/64 (0.0)	1/34 (2.9)	1/47 (2.1)
Total	4/256 (1.6)	3/174 (1.7)	2/185 (1.1)

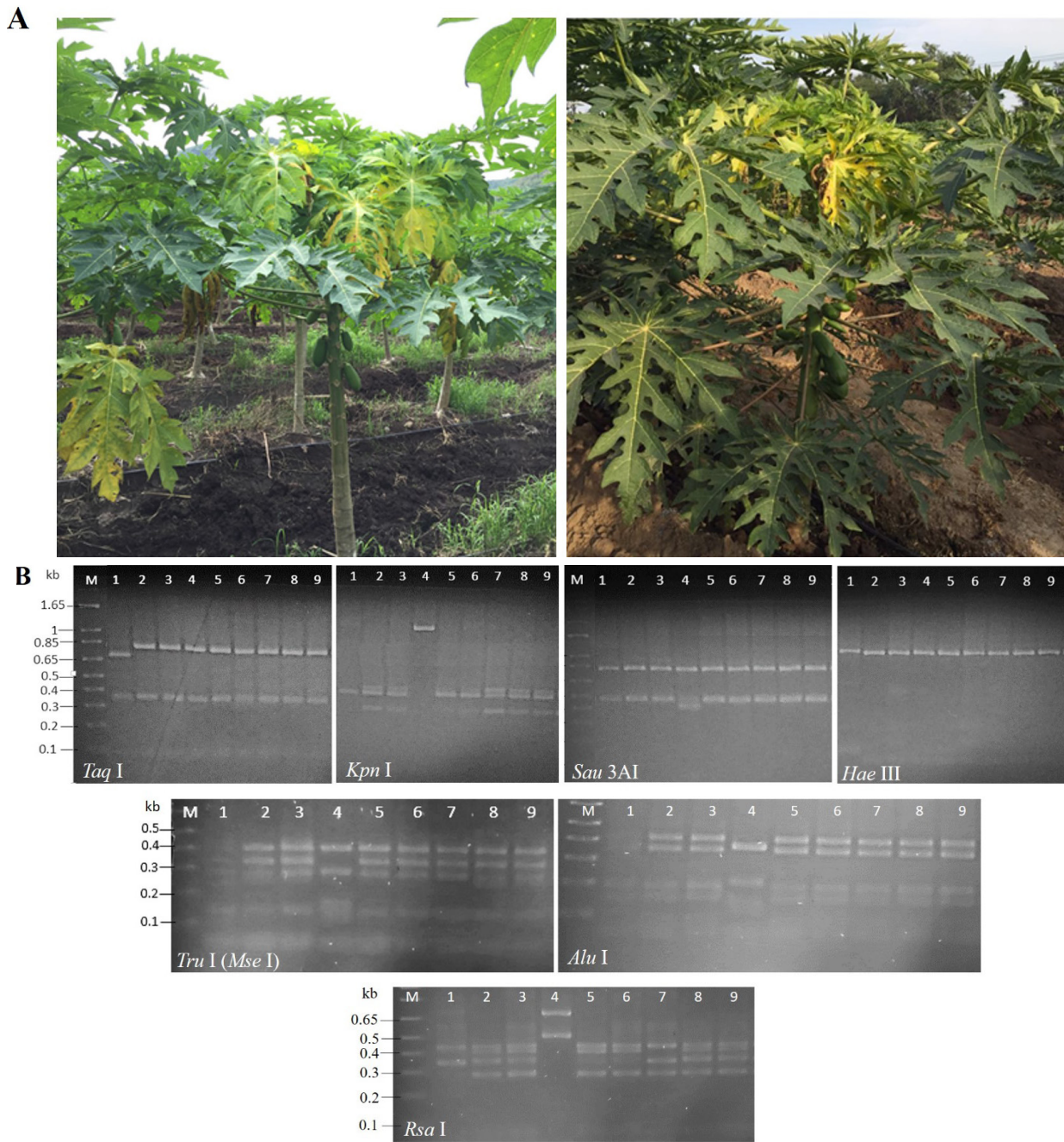


Figura 1. Detección de fitoplasmas en agroecosistemas de papaya con Bunchy Top en Colima, México. **A)** Plantas de papaya con tallos con acortamiento de entrenudos y hojas amarillas y cloróticas, positivas a fitoplasmas. **B)** Perfiles RFLPs *in vitro* del gen *16Sr* (iniciadores R16F2n/R16R2) de los fitoplasmas en estudio. Carriles 1-4: muestras 1S-4S-papaya, Carriles 5-6: muestras 5S-6S-*Amaranthus palmeri*; Carril 7: muestra 7S-*Echinochloa colona*; Carril 8: muestra 8S-*Microtalis calva*; y Carril 9: muestra 9S-*Balclutha mexicana*. El ADN se digirió con 10 U de cada enzima y los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa 3% (p/v) en TAE 1×. Carril M: marcador de masa molecular 1 kb plus (Thermo Scientific, EUA).

por secuenciación de los genes *secA* (GenBank: ON303285-ON303288) y *16Sr* (GenBank: PP348058-PP348061). Los análisis de secuencias de los genes *secA* y *16Sr* con BLASTn, indican que, en dos de las cuatro muestras positivas, los fitoplasmas pertenecen al grupo 16SrI (GenBank *secA*: ON303286 y ON303287; *16Sr*: PP348059 y PP348060), mientras que las dos restantes a los grupos 16SrX (GenBank *secA*: ON303288; *16Sr*: PP348061) y 16SrXIII (GenBank *secA*: ON303285; *16S*: PP348058), respectivamente.

El perfil de los RFLPs *in vitro* del gen *16Sr* (Figura 1B) mostró concordancia con los perfiles reportados por Lee *et al.* (1998) y con los obtenidos con iPhyClassifier (Figura 2), para las enzimas de restricción usadas, lo cual permitió autenticar el

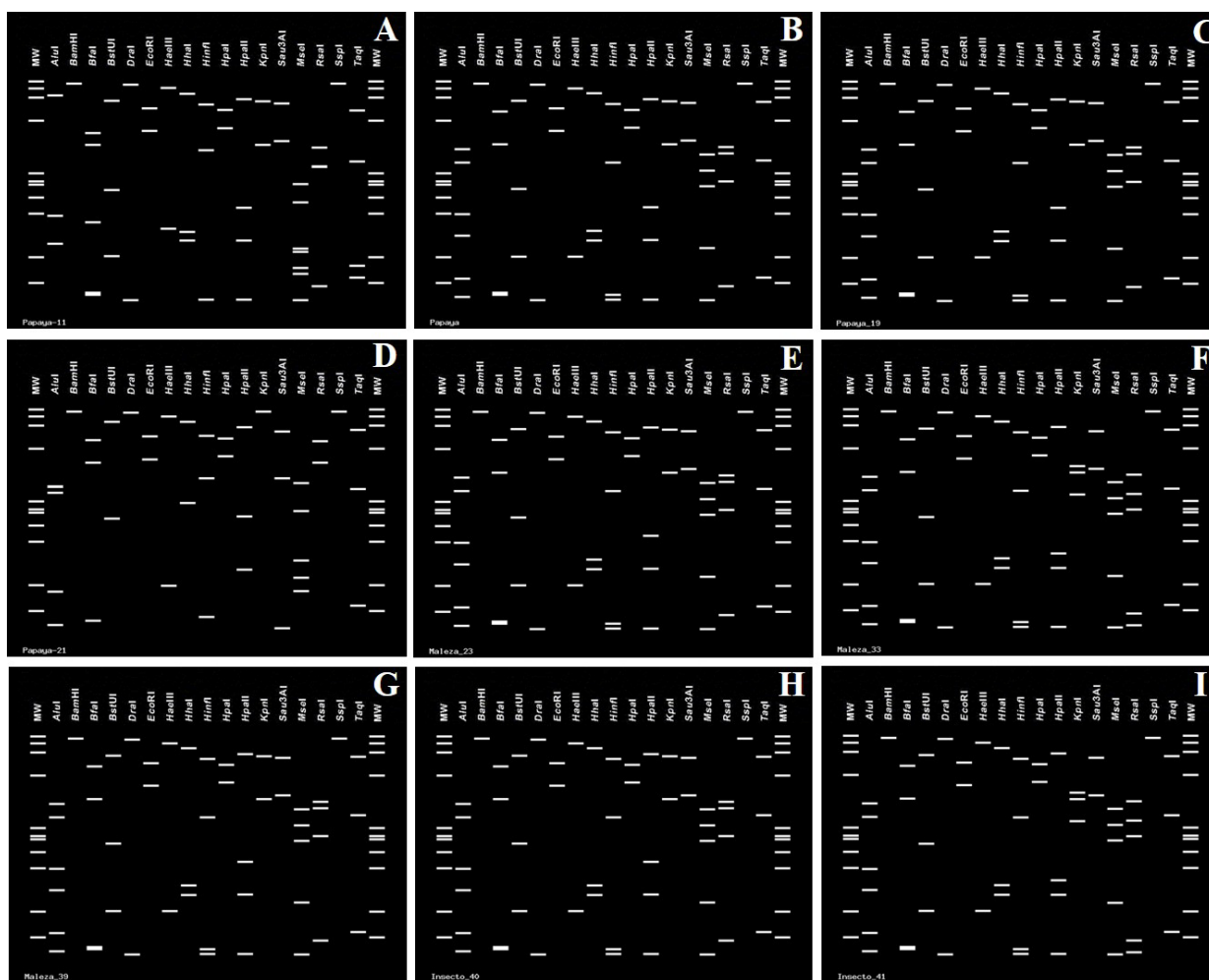


Figura 2. Perfiles RFLPs *in silico* del gen *16Sr* de los fitoplasmas en estudio, generados con iPhyClassifier con 17 enzimas de restricción. A) muestra 1S-papaya; B) muestra 2S-papaya; C) muestra 3S-papaya; D) muestra 4S-papaya, E) muestra 5S-*Amaranthus palmeri*; F) muestra 6S-*Amaranthus palmeri*; G) muestra 7S-*Echinochloa colona*; H) muestra 8S-*Micruttalis calva*; I) muestra 9S-*Balclutha mexicana*. Carriles MW: ADN de ϕ X174 digerido con *Hae* III.

ADN de los fitoplasmas detectados en este estudio. El análisis RFLPs *in silico* del gen *16Sr* confirmó la presencia de las especies ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ [grupo 16SrI (porcentajes de identidad: 99.44 y 99.60) y subgrupo 16SrI-AF (coeficiente de similitud: 1.00)], ‘*Ca. Phytoplasma rhamni*’ [grupo 16SrX (porcentaje de identidad: 93.31), subgrupo indeterminado] y ‘*Ca. Phytoplasma hispanicum*’ [grupo 16SrXIII (porcentaje de identidad: 99.37), subgrupo 16SrXIII-D (coeficiente de similitud: 0.95)] (Cuadro 2). Con respecto a los porcentajes de identidad y coeficiente de similitud obtenidos para los fitoplasmas de los grupos 16SrX y 16SrXIII, deberá analizarse con otros estudios, si se trata de nuevos (sub)grupos.

Cuadro 2. Fitoplasmas identificados en papaya, malezas e insectos asociados al cultivo en Colima, México, durante noviembre-diciembre de 2019.

Muestra (GenBank <i>16Sr</i>)	‘ <i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma</i> sp.’	Grupo 16Sr (% identidad)	Subgrupo (coeficiente de similitud)
1S-papaya (PP348058)	‘ <i>Ca. Phytoplasma hispanicum</i> ’	16SrXIII (99.37)	D (0.95) ^y
2S-papaya (PP348059)	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’	16SrI (99.44)	AF (1.00)
3S-papaya (PP348060)	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’	16SrI (99.60)	AF (1.00)
4S-papaya (PP348061)	‘ <i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> ’	16SrX (93.31)	NA ^z
5S- <i>Amaranthus palmeri</i> (PP348062)	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’	16SrI (99.44)	AF (1.00)
6S- <i>Amaranthus palmeri</i> (PP348063)	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’	16SrI (99.68)	B (0.98)
7S- <i>Echinochloa colona</i> (PP348064)	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’	16SrI (99.60)	AF (1.00)
8S- <i>Micrualtis calva</i> (PP348065)	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’	16SrI (99.52)	AF (1.00)
9S- <i>Balclutha mexicana</i> (PP348066)	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’	16SrI (99.68)	B (0.98)

^yPotencial nuevo subgrupo.

^zNA: no aplica en función del bajo porcentaje de identidad del grupo asignado en *iPhyClassifier*.

La identificación de los grupos de fitoplasmas aquí obtenidos también se corroboró por inferencias filogenéticas de los genes *secA* y *16Sr*, puesto que en las filogenias obtenidas para ambos genes de los fitoplasmas detectados en este estudio, se agruparon con secuencias correspondientes a los mismos grupos 16Sr de fitoplasmas previamente identificados en México (GenBank *16S*: MN807429) o en otros países (Figura 3).

Para nuestro conocimiento, este estudio documenta por primera vez la presencia de fitoplasmas 16SrI-AF, 16SrX y 16SrXIII en plantas de papaya con BT en México y Colima. Además, a nivel mundial, es la primera vez que se reporta la presencia del grupo 16SrX en papaya. En México, la primera detección de fitoplasmas en papaya se hizo por microscopía electrónica de barrido en Baja California Sur (Poghosyan *et al.*, 2004). Posteriormente, mediante biología molecular, en Yucatán,

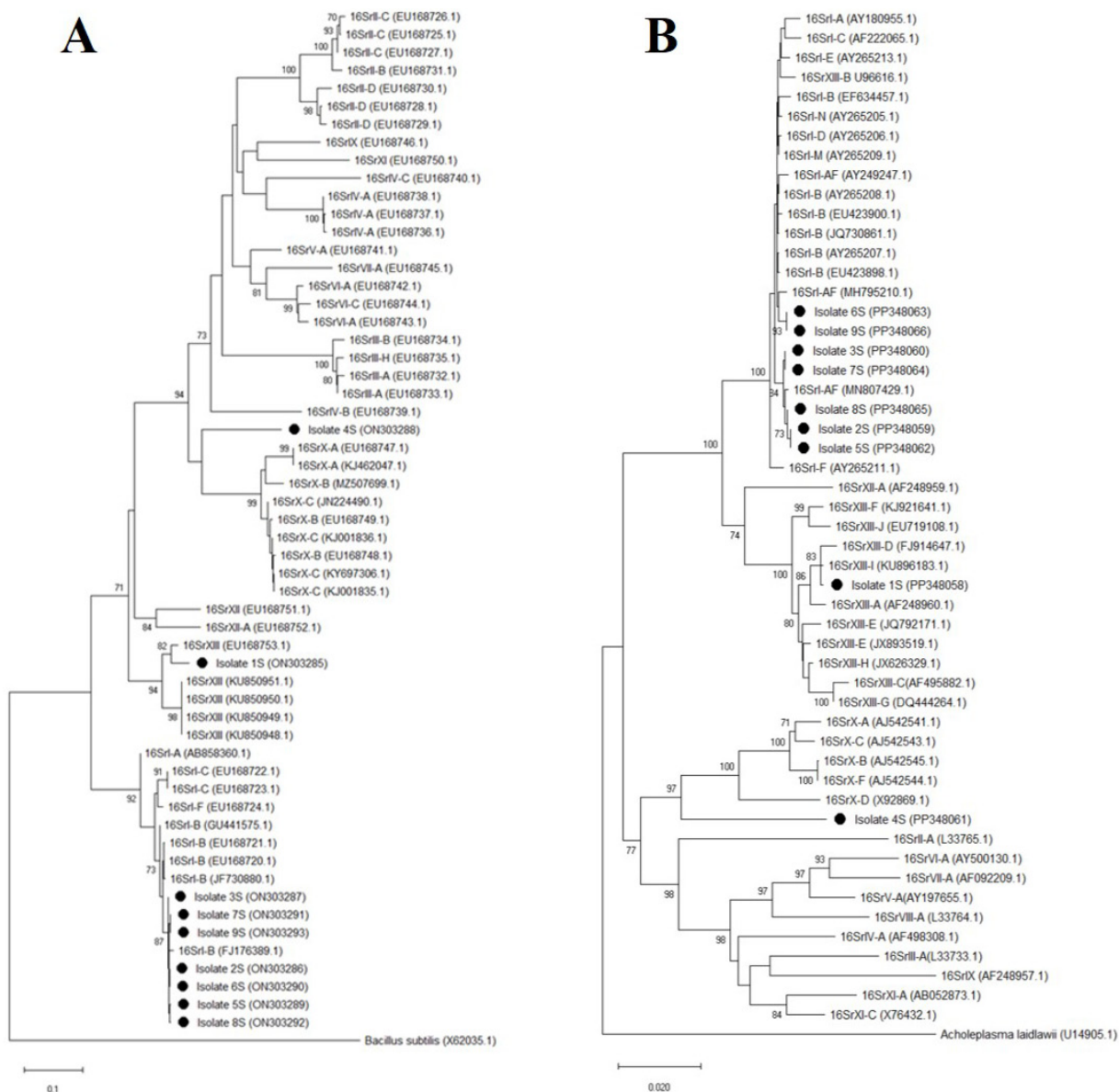


Figura 3. Árboles filogenéticos de los genes *secA* (A) y *16Sr* (B) obtenidos con el método de neighbor-joining de grupos 16Sr de fitoplasmas identificados en agroecosistemas de papaya en Colima, México (círculos negros) y de grupos de fitoplasmas de otras partes del mundo. Los números de acceso se muestran en paréntesis. Muestras 1S-4S: papaya, muestras 5S-6S: *Amaranthus palmeri*, muestra 7S: *Echinochloa colona*, muestra 8S: *Microtalis calva*, muestra 9S: *Balclutha mexicana*. La secuencia del gene *secA* de *Bacillus subtilis* y la del *16Sr* de *Acholeplasma laidlawii* se usaron como grupos externos. En cada filogenia, los valores de bootstrap (por 1000 réplicas, mayores a 70 %) se muestran en las ramas. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

Campeche, Quintana Roo (Navarrete-Yabur *et al.*, 2005), Michoacán y Veracruz, donde las muestras positivas se asignaron al subgrupo 16SrI-C (Rojas-Martínez *et al.*, 2011).

Además de su detección en México, el grupo 16SrI se ha reportado en papaya en Cuba (Acosta *et al.*, 2011; 2017; Acosta-Pérez *et al.*, 2017), Perú (Hodgetts *et al.*, 2009), Sri-Lanka (Abeysinghe *et al.*, 2014) y China (Yu *et al.*, 2023), mientras que el 16SrXIII solamente en Brasil (Melo *et al.*, 2013). Otros grupos de importancia económica en papaya son 16SrII (por ej. White *et al.*, 1998; Panda *et al.*, 2022), 16SrXII (por ej. Gibb *et al.*, 1996; Barbieri *et al.*, 2023), 16SrXV (Wei *et al.*, 2017) y 16SrXVII (Arocha *et al.*, 2005).

En México, nunca se ha reportado la presencia del grupo 16SrX (Pogoshyan-Melkonyan *et al.*, 2019), mientras que el 16SrXIII sólo se ha asociado a plantas de papa y jitomate en Sinaloa (Santos-Cervantes *et al.*, 2010) y Baja California Sur (Holguín-Peña *et al.*, 2007). Próximamente, deberá determinarse si el bajo porcentaje de detección de fitoplasmas se debe a la presencia de otros organismos, como rickettsias o virus, que estén induciendo los síntomas estudiados (Davis *et al.*, 1998; Arocha *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2013; Luis-Pantoja *et al.*, 2015).

En el caso de malezas e insectos, la detección de fitoplasmas fue positiva en tres de 174 (1.7%) y dos de 185 (1.1%) muestras, respectivamente, y con excepción de Ixtlahuacán, los ejemplares positivos se obtuvieron a pesar de no haber registrado fitoplasmas en plantas de papaya (Cuadro 1). Colima fue el único municipio donde no hubo malezas ni insectos positivos a fitoplasmas (Cuadro 1).

Las malezas en donde se detectaron los fitoplasmas fueron asintomáticas, dos de ellas se identificaron como *Amaranthus palmeri* (Amaranthaceae) (GenBank 16S: PP348062-PP348063, *secA*: ON303289-ON303290) y la otra como *Echinochloa colona* (Poaceae) (GenBank 16S: PP348064, *secA*: ON303291). Los insectos se identificaron como *Micrutalis calva* (Hemiptera: Membracidae) (GenBank 16S: PP348065, *secA*: ON303292) y *Balclutha mexicana* (Hemiptera: Cicadellidae) (GenBank 16S: PP348066, *secA*: ON303292) (Cuadro 2).

Los análisis RFLPs *in silico* del gen 16Sr permitieron asignar los fitoplasmas detectados a la especie '*Ca. Phytoplasma asteris*' (grupo 16SrI, porcentaje de identidad: 99.44-99.68), subgrupos 16SrI-AF (coeficiente de similitud: 1.00) en *A. palmeri* (muestra 5S), *E. colona* (muestra 7S) y *M. calva* (muestra 8S), y 16SrI-B (coeficiente de similitud: 0.98) en *A. palmeri* (muestra 6S) y *B. mexicana* (muestra 9S) Cuadro 2).

La detección de fitoplasmas en insectos y malezas asociadas a los agroecosistemas de papaya, sugiere que los artrópodos diseminan las bacterias entre plantas y que las malezas pueden jugar un papel importante como fuente de inóculo (Duduk *et al.*, 2018). Para México, la presente investigación es pionera en indagar si las malezas e insectos asociados a la papaya son portadores/fuente de inóculo de

fitoplasmas, siendo la primera vez que se reportan como especies portadoras de fitoplasmas del grupo 16SrI en agroecosistemas de papaya. Las malezas se suman a los registros de las que se han asociado al cultivo de papaya, y que se han reportado como hospedantes de fitoplasmas 16SrII en Cuba y Etiopía, tales como *Anoda acerifolia* (Malvaceae), *Euphorbia heterophylla* (Euphorbiaceae), *Malvastrum coromandelianum* (Malvaceae) y *Rhynchosia minima* (Fabaceae) (Arocha *et al.*, 2007; Bekele *et al.*, 2011). Aun cuando *A. palmeri* es una maleza común en diferentes agroecosistemas mexicanos, solo se ha reportado como hospedante de fitoplasmas del grupo 16SrIII como maleza asociada al cultivo de lufa (*Luffa acutangula*) (Cucurbitaceae) (Santos-Cervantes *et al.*, 2021).

Respecto a los insectos *B. mexicana* y *M. calva*, es la primera vez que se registran como portadores de fitoplasmas en agroecosistemas de papaya. Previamente sólo se había documentado la detección positiva de fitoplasmas en ejemplares del género *Orosius* en Australia (Padovan y Gibb, 2001), de *E. papayae* en Cuba (Acosta-Pérez *et al.*, 2010; Acosta *et al.*, 2017) y *E. stevensi* en Trinidad (Haque y Parasram, 1973). Sin embargo, hasta la fecha, sólo se ha demostrado experimentalmente la capacidad vectorial de *E. stevensi* en Trinidad (Haque y Parasram, 1973) y de *E. papayae* en Puerto Rico (Adsuar, 1946) y Cuba (Acosta-Pérez *et al.*, 2010; Acosta *et al.*, 2017).

Sobre *Balclutha*, en México este género forma parte de la entomofauna en agroecosistemas de *Vaccinium corymbosum* (Pérez-Mejía *et al.*, 2020), *Vitis vinifera* (Almendra-Paxtlan *et al.*, 2021), *Capsicum annuum* (Velásquez-Valle *et al.*, 2018) y *Zea mays* (Pinedo-Escatel y Moya-Raygoza, 2018), pero ni el género ni alguna especie se han reportado como portadores de fitoplasmas. En otros países, sólo en ejemplares de la especie *B. hebe* se ha detectado fitoplasmas del grupo 16SrXIII en *Brassica oleracea* (Canale y Bedendo, 2020), 16SrI en *Solanum tuberosum* (Girsova *et al.*, 2016), 16SrII en *Trigonella foenum-graecum* (Malik *et al.*, 2020) y 16SrIX en *Prunus dulcis* (Dakhil *et al.*, 2011).

Con respecto a *Micrutalis*, su presencia en México se ha registrado en agroecosistemas de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*) y *Prosopis* (Salas-Araiza y Boradonenko 2006), y la especie *M. calva* en *Z. mays* (Pinedo-Escatel, 2014). *Micrutalis calva* posee capacidad vectorial del *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV) en jitomate en Florida (Simons y Coe, 1958).

Con base en la importancia que tiene la papaya en México y en otros países donde se cultiva, se determinará próximamente si *B. mexicana* y *M. calva* tienen la capacidad de transmitir fitoplasmas en papaya y en las malezas que conforman su agroecosistema.

En este estudio se reporta por primera vez la presencia de fitoplasmas 16SrI-AF, 16SrX y 16SrXIII en plantas de papaya con síntomas de Bunchy Top en agroecosistemas del estado de Colima, México. Los fitoplasmas de los grupos 16SrX y 16Sr-

XIII se reportan por primera vez a nivel mundial y en México en papaya, respectivamente. Las malezas *Amaranthus palmeri* y *Echinochloa colona*, y los insectos *Microtalis calva* y *Balclutha mexicana*, asociados a los agroecosistemas de papaya, son portadores de fitoplasmas subgrupos 16SrI-AF y 16SrI-B, lo que los constituye nuevos registros como reservorios naturales y potenciales vectores de las bacterias.

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA México) por el financiamiento de este proyecto. A los productores de papaya del estado de Colima para la recolección de las muestras. A los revisores anónimos de este manuscrito, por sus valiosos comentarios. Pedro Valadez-Ramírez agradece al Colegio de Postgraduados por el apoyo otorgado para la realización de sus estudios de doctorado.

LITERATURA CITADA

- Abeysinghe S, Kumari WGSM, Arachchi IMM and Dickinson M. 2014. First report of the molecular identification of a phytoplasma associated with dieback disease of papaya in Sri Lanka. *New Disease Reports* 29:13. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.013>
- Acosta KI, Zamora L, Piñol B, Quiñones ML, Ramos PL, Luis M, Leyva NE and Arocha Y. 2017. *Empoasca papayae* Oman, 1937 (Hemiptera: Cicadellidae) the simultaneous vector of phytoplasmas and rickettsia associated with “Bunchy Top Symptom” in Cuba. *Annals of Biology* 39:35–42. <https://doi.org/10.6018/analesbio.39.03>
- Acosta K, Zamora L, Fernández A, Arocha Y, Martínez Y, Santos ME, Méndez J, Chávez A and Leyva NE. 2011. First report of ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ (group 16SrI) affecting papaya in Cuba. *New Disease Reports* 24:29. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2011.024.029>
- Acosta K, Zamora L, Piñol B, Fernández A, Chávez A, Flores G, Méndez J, Santos ME, Leyva NE and Arocha Y. 2013. Identification and molecular characterization of phytoplasmas and rickettsia pathogens associated with ‘Bunchy top symptom’ (BTS) and ‘Papaya bunchy top’ (PBT) of papaya in Cuba. *Crop Protection* 45:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.11.016>
- Acosta-Pérez KI, Piñol-Pérez BE, Zamora-Gutiérrez L, Quiñones-Pantoja MI, Miranda-Cabrera I, Leyva-López NE and Arocha-Rosete Y. 2017. A phytoplasma representative of a new subgroup 16SrI-Z associated with Bunchy Top Symptoms (BTS) on papaya in Cuba. *Revista de Protección Vegetal* 32:52–59.
- Acosta-Pérez K, Piñol B, Arocha-Rosete Y, Wilson M, Boa E and Lucas J. 2010. Transmission of the phytoplasma associated with bunchy top symptom of papaya by *Empoasca papaya* Oman. *Journal of Phytopathology* 158:194–196. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01590.x>
- Adsuar J. 1946. Transmission of papaya bunchy top by a leaf hopper of the genus *Empoasca*. *Science* 103:316. <https://doi.org/10.1126/science.103.2671.316>
- Ahrens U and Seemüller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like-organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828–832. <https://doi.org/10.1094/Phyto-82-828>
- Almendra-Paxtlán L, García-Martínez O, Robles-Hernández VE and Sánchez-Peña SR. 2021. Cicadomorpha in a vineyard at Parras Coahuila, Mexico, and vectors of diseases. *Southwestern Entomologist* 46:147–152. <https://doi.org/10.3958/059.046.0114>
- Arocha I, Horta D, Peralta E and Jones P. 2003. First report on molecular detection of phytoplasmas in papaya in Cuba. *Plant Disease* 87: 1148. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.9.1148C>

- Arocha Y, López M, Piñol B, Fernández M, Picornell B, Almeida R, Palenzuela I, Wilson MR and Jones P. 2005. ‘*Candidatus Phytoplasma graminis*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma caricae*’, two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:2451–2463. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63797-0>
- Arocha Y, Piñol B, López M, Miranda I, Almeida R, Wilson M and Jones P. 2007. Bunchy top symptom of papaya in Cuba: new insights. *Bulletin of Insectology* 60:393–394.
- Barbieri C, Contaldo N, Sciovolone A and Bertaccini A. 2023. Phytoplasmas in papaya: detection and identification. *Phytopathogenic Mollicutes* 13:145–146. <https://doi.org/10.5958/2249-4677.2023.00073.7>
- Bekele B, Hodgetts J, Tomlinson J, Boonham N, Nikolić Swarbrick P and Dickinson M. 2011. Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and XII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. *Plant Pathology* 60:345–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02384.x>
- Canale MC and Bedendo IP. 2020. Report of ‘*Candidatus Phytoplasma hispanicum*’ (16SrXIII-E) associated with cauliflower stunt in São Paulo State, Brazil, and *Balclutha hebe* as its potential vector. *Plant Disease* 104:967. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2111-PDN>
- COEPAPAYA, Consejo Estatal de Productores de Papaya de Colima A.C. 2017. Calidad y mejora continua ante un mercado internacional exigente. https://www.redinnovagro.in/casosexito/2017/Papaya_COEPAPAYA.pdf (consulta, agosto 2020).
- Cook MT. 1931. New virus diseases of plants in Porto Rico. *The Journal of the Department of Agriculture of Porto Rico* 15:193–195. <https://doi.org/10.46429/jaupr.v15i2.14232>
- Dakhil HA, Hammad EAF, El-Mohtar C and Abou-Jawdah Y. 2011. Survey of leafhopper species in almond orchards infected with almond witches’-broom phytoplasma in Lebanon. *Journal of Insect Science* 11:60. <https://doi.org/10.1673/031.011.6001>
- Davis M, Ying Z, Brunner B, Pantoja A and Fewerda F. 1998. Rickettsial relative associated with papaya bunchy top disease. *Current Microbiology* 36:80–84. <https://doi.org/10.1007/s002849900283>
- Deng S and Hiruki C. 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)
- Dickinson M and Hodgetts J. 2013. PCR analysis of phytoplasmas based on the secA gene. Pp:205-216. In: Dickinson M and Hodgetts J (eds.). *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol. 938. Humana Press. Totowa, NJ. 421p. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_17
- Duduk B, Stepanović J, Yadav A and Rao GP. 2018. Phytoplasmas in weeds and wild plants. Pp:313-345. In: Rao G, Bertaccini A, Fiore N, Liefting L (eds.). *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - I*. Springer. Singapore. 345p. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3_11
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294–299.
- Girsova NV, Bottner-Parker KD, Bogotdinov DZ, Meshkov YI, Mozhaeva KA, Kastalyeva TB and Lee IM. 2016. Diverse phytoplasma associated with potato stolbur and other related potato diseases in Russia. *European Journal of Plant Pathology* 145:139–153. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0824-3>
- Gundersen D.E and Lee I-M. 1996. Ultrasensitive detection of Phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144–151.
- Haque SQ and Parasram S. 1973. *Empoasca stevensi*, a new vector of bunchy top disease of papaya. *Plant Disease Reporter* 57:412–413.
- Hodgetts J, Chuqillangui C, Muller G, Arocha Y, Gamarra D, Pinillos O, Velit E, Lozada P, Boa E, Boonham N, Mumford R, Barker I and Dickinson M. 2009. Surveys reveal the occurrence of phytoplasmas in plants at different geographical locations in Peru. *Annals of Applied Biology* 155:15–27. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00316.x>
- Holguín-Peña RJ, Vázquez-Juárez RC and Martínez-Soriano JP. 2007. First report of a 16SrI-B group phytoplasma associated with a yellows-type disease affecting tomato plants in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease* 91:328. <https://doi.org/10.1094/PDIS91-3-0328B>

- Kazeem SA, Inaba J, Zhao Y, Zwolinska A, Ogunfunmilayo AO, Arogundade O and Wei W. 2021. Molecular identification and characterization of ‘*Candidatus Phytoplasma convolvuli*’-related strains (representing a new 16SrXII-O subgroup) associated with papaya bunchy top disease in Nigeria. *Crop Protection* 148:105731. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105731>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lee I-M, Gundersen-Rindal DE, Davis RE and Bartoszyk IM. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1153–1169. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1153>
- Lee I, Hammond RW, Davis RE and Gundersen DE. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834–842. <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-834>
- Luis-Pantoja M, Ramos-González PI, Naranjo M, Hernández-Rodríguez L, Rodríguez J and Pérez-López E. 2015. *Rickettsia*-related bacteria associated with papaya plants showing bunchy top disease in Cuba. *Journal of General Plant Pathology* 81:166–168. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0571-x>
- Malik ST, Ahmad JN, Sharif MZ, Trebicki P, Tahir M and Bertaccini A. 2020. Molecular detection and characterisation of phytoplasma in *Trigonella foenum-graecum* and identification of potential insect vectors in Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 52:1605–1613. [https://doi.org/10.30848/PJB2020-5\(16\)](https://doi.org/10.30848/PJB2020-5(16))
- Martorell LF and Adsuar J. 1952. Insects associated with papaya virus diseases in the Antilles and Florida. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 34:319–329. <https://doi.org/10.46429/jaupr.v36i4.12786>
- Melo L, Silva E, Flôres D, Ventura J, Costa H and Bedendo I. 2013. A phytoplasma representative of a new subgroup, 16SrXIII-E, associated with papaya apical curl necrosis. *European Journal of Plant Pathology* 137:445–450. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0267-7>
- Navarrete-Yabur A, González-Losa M and Moreno-Valenzuela O. 2005. Detection and identification of phytoplasma in cultivated and wild papaya plants in the Yucatan peninsula. *Phytopathology* 95:S74.
- Oxelman B, Lidén M and Berglund D. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe *Sileneae* (*Caryophyllaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 206:393–410. <https://doi.org/10.1007/BF00987959>
- Padovan AC and Gibb KS. 2001. Epidemiology of phytoplasma diseases in papaya in Northern Australia. *Journal of Phytopathology* 149: 649–658. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00688.x>
- Panda P, Singh SK, Mall S and Rao GP. 2022. Multilocus gene-based characterization of peanut witches’ broom related phytoplasma strain associated with flower malformation of papaya in India. *Indian Phytopathology* 75:1211–1216. <https://doi.org/10.1007/s42360-022-00547-z>
- Pérez-Mejía FA, Ortega-Arenas LD, Bautista-Martínez N, Blanco-Rodríguez E y López-Buenfil JA. 2020. Cicadélidos asociados a arándano en Jalisco, México. *Southwestern Entomologist* 45:275–288. <https://doi.org/10.3958/059.045.0129>
- Pinedo-Escatel JA. 2014. Abundancia y riqueza de membracoideos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) en maíz durante la estación lluviosa en Las Agujas, Zapopan, Jalisco. *Dugesiana* 21:49–53.
- Pinedo-Escatel JA and Moya-Raygoza G. 2018. Diversity of leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) associated with border grasses and maize during the wet and dry seasons in Mexico. *Environmental Entomology* 47:282–291. <https://doi.org/10.1093/ee/nvx204>
- Poghosyan AV, Lebsky VK, Arce-Montoya M and Landa L. 2004. Possible phytoplasma disease in papaya (*Carica papaya* L.) from Baja California Sur: diagnosis by scanning electron microscopy. *Journal of Phytopathology* 152:376–380. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00847.x>
- Pogoshyan-Melkonyan A, Lebsky V, Rojas-Martínez RI, Oropeza-Salín C, Narváez-Cab M y Córdova-Lara I. 2019. Fitoplasmas y su estudio en México. Pp:30-70. In: Álvarez-Sánchez F. J, Rodríguez-Guzmán P y Alarcón A (coord.). Biodiversidad de microorganismos de México. Importancia, aplicación y conservación. UNAM: México. 682p.
- Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E y Rivas-Valencia P. 2011. Presencia de fitoplasmas en papayo (*Carica papaya*) en México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 17:47–50.
- Salas-Araiza MD y Boradonenko A. 2006. Insectos asociados al amaranto *Amaranthus hypocondriacus* L. (Amaranthaceae) en Irapuato, Guanajuato, México. *Acta Universitaria* 16:50–55.

- Sambrook J and Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY, USA. 1659p.
- Santos-Cervantes ME, Camacho-Bojórquez JE, Escobedo-Rivera UR, Méndez-Lozano J and Leyva-López NE. 2021. Molecular characterization of group 16SrI and 16SrIII phytoplasmas associated with loofah witches' broom disease in Sinaloa, Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 43:366–373. <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1817794>
- Santos-Cervantes ME, Chávez-Medina JA, Acosta-Pardini J, Flores-Zamora GL, Méndez-Lozano J and Leyva-López NE. 2010. Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. *Plant Disease* 94:388–395. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-4-0388>
- Schneider B, Seemüller 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*. Academic Press, San Diego. 466p. <https://doi.org/10.1016/B978-012583805-4/50040-6>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. Atlas agroalimentario 2020. www.gob.mx/siap/ (consulta, septiembre 2020).
- Simons JN and Coe DM. 1958. Transmission of pseudo-curly top virus in Florida by a treehopper. *Virology* 6:43–48. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(58\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(58)90058-8)
- Stillson PT and Szendrei Z. 2020. Identifying leafhopper targets for controlling aster yellows in carrots and celery. *Insects*, 2:411. <https://doi.org/10.3390/insects11070411>
- Story GE and Halliwell RS. 1969. Association of a mycoplasma-like organism with the bunchy top disease of papaya. *Phytopathology* 59:1336–1337.
- Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR and Fernández-Martínez M. 2018. Diversity of leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) collected in chili parcels in northern-central Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9:1289–1293.
- Wei W, Pérez-López E, Davis RE, Bermúdez-Díaz L, Granda-Wong C, Wang J and Zhao Y. 2017. ‘*Candidatus* Phytoplasma brasiliense’-related strains associated with papaya bunchy top disease in northern Peru represent a distinct geographic lineage. *Crop Protection* 92:99–106. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.024>
- White DT, Blackall LL, Scott PT and Walsh KB. 1998. Phylogenetic positions of phytoplasmas associated with dieback, yellow crinkle and mosaic diseases of papaya, and their proposed inclusion in ‘*Candidatus* Phytoplasma australiense’ and a new taxon, ‘*Candidatus* Phytoplasma australasia’. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:941–951. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-941>
- Yu SS, Zhu AN and Song WW. 2023. *Carica papaya* represents a new host of 16SrI-B subgroup phytoplasma associated with yellow symptoms in China. *Plant Disease* 107:211. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-22-0692-PDN>