



CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Artículo original de investigación

Actualización de aspectos claves para la epidemiología del amarillamiento letal del cocotero en Cuba

Camilo Paredes Tomás ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-7129-7134>
Maritza Luis Pantoja ¹ <https://orcid.org/0000-0001-8621-3901>
Assunta Bertaccini ² <https://orcid.org/0000-0002-5650-1512>
Jorge Luis Rodríguez Tapia ¹ <https://orcid.org/0000-0002-9352-1969>
Carlos Oropeza Salín ³ <https://orcid.org/0000-0002-7352-3692>
Wayne Myrie ⁴ <https://orcid.org/0000-0001-8969-1204>
María Narvaéz Cab ³ <https://orcid.org/0000-0002-9537-4923>
Francesco Pacini ² <https://orcid.org/0009-0003-6208-318X>

¹ Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. La Habana, Cuba

² Universidad de Bolonia. Bolonia, Italia

³ Centro de Investigación Científica de Yucatán. Yucatán, México

⁴ Consejo de Industrias del Coco. Kingston, Jamaica

*Autor de correspondencia: camptomas1@gmail.com

RESUMEN

Introducción: El amarillamiento letal del cocotero constituye uno de los principales retos en la región del Caribe. **Objetivos:** Caracterizar la diversidad de los fitoplasmas asociados a la sintomatología del amarillamiento letal detectada en ecosistemas cocoteros cubanos; caracterizar los fitoplasmas asociados a amarillamiento letal presentes en hospedantes alternativos y en insectos vectores potenciales; c) comprobar la transmisión de fitoplasmas asociados a amarillamiento letal por los vectores potenciales identificados. **Métodos:** Se caracterizó los fitoplasmas asociados a la enfermedad en cocoteros cubanos, así como en hospedante alternativo e insecto vector potencial a través análisis PCR- RFLP, secuenciación y filogenia. Se realizaron ensayos de transmisión experimental mediante insectos adultos de *Haplaxius crudus* colectados en plantaciones con cocoteros sintomáticos a la enfermedad. **Resultados:** El subgrupo 16SrIV-A resultó predominante en las plantas sintomáticas de cocotero. Sin embargo, también se detectaron por primera vez fitoplasmas de los grupos ribosomales 16Srl, -VII y -XII en cocoteros dentro de las áreas afectadas. El empleo del gen groEL, posibilitó por primera vez discriminar diferentes aislados en las poblaciones cubanas del subgrupo 16SrIV-A acorde a su origen geográfico. La detección y caracterización de fitoplasmas infectando *Pritchardia pacifica* y *Hortensia similis* evidenció por primera vez un hospedante alternativo y un vector potencial de aislados de Candidatus *Phytoplasma palmae* en Cuba, respectivamente. Se confirmó *H. crudus* como vector de aislados de *Ca. P. palmae* mediante transmisión experimental exitosa. **Conclusiones:** Estos nuevos aspectos epidemiológicos resaltan la complejidad del patosistema en las condiciones cubanas y son fundamentales para el perfeccionamiento del manejo de la misma.

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Palabras clave: epidemiología; amarillamiento letal del cocotero; fitoplasmas; vectores; hospedantes alternativos

Update of key aspects for the epidemiology of lethal yellowing of coconut in Cuba

ABSTRACT

Introduction: Lethal yellowing of coconut constitutes one of the main challenges in the Caribbean region. **Objectives:** To characterize the diversity of phytoplasmas associated with the observed symptom of lethal yellowing in Cuban coconut ecosystems; to characterize the lethal yellowing-associated phytoplasmas detected in alternative hosts and potential insect vectors; to verify the transmission of lethal yellowing-associated phytoplasmas by the identified potential insect vectors. **Methods:** The characterization of lethal yellowing-associated phytoplasmas detected in coconut as well as in alternative plant host and potential insect vector were characterized by PCR-RFLP analysis, sequencing and phylogeny. Experimental transmission tests were carried out using adults of *Haplaxius crudus* collected on symptomatic plants in coconut plantations. **Results:** The subgroup 16SrIV-A was predominant in symptomatic coconut plants. However, phytoplasmas of ribosomal groups 16SrI, -VII and -XII were also detected for the first time in coconut within the affected areas. The use of the *groEL* gene allowed discriminating different isolates in the Cuban populations of the 16SrIV-A according to their geographical origin. For the first time, the detection and characterization of phytoplasmas infecting *Pritchardia pacifica* and *Hortensia similis* evidenced it as alternative plant host and as potential vector of *Candidatus Phytoplasma palmae* isolates, respectively. The successful experimental transmission confirmed *Haplaxius crudus* as a vector of *Ca. P. palmae* isolates. **Conclusions:** These new epidemiological aspects highlight the complexity of the pathosystem in Cuban conditions and are fundamental for the improvement of its management.

Keywords: epidemiology; lethal yellowing of coconut; phytoplasmas; vectors; alternative hosts

INTRODUCCIÓN

El coco es la sexta especie frutal más cultivada del mundo al ser uno de los cultivos perennes más rentables. Esto se debe principalmente, entre otros aspectos a la amplia variedad de productos obtenidos de esta palma, especialmente el agua de coco, la leche de coco y el aceite de su nuez. ⁽¹⁾ En Cuba tradicionalmente más del 80 % de su producción se ha concentrado en localidades de Niquero y Pílon (provincia de Granma) y Baracoa (provincia de Guantánamo), así como algunos municipios de la región central del país. ⁽²⁾

Una de las principales limitantes bióticas del cultivo son las enfermedades similares a amarillamiento letal (LYD), entre las que resalta, por su importancia económica, el amarillamiento letal del cocotero (LY) que constituye uno de los principales retos para esta industria en Latinoamérica y el Caribe. ^(3,4) Los agentes asociados a su ocurrencia se clasifi-

caron principalmente dentro del grupo ribosómico 16SrIV. ⁽⁵⁾ Sin embargo, en varias regiones geográficas se han asociado fitoplasmas de otros grupos 16S. ⁽⁶⁾ Desde el punto de vista epidemiológico, se han confirmado numerosos géneros vegetales infectados con estos fitoplasmas lo que constituye un elemento esencial al actuar como reservorios que pueden comprometer el cultivo. ⁽⁷⁾ En este sentido existe un número creciente de especies de insectos clasificadas como potenciales en base a la detección de estos fitoplasmas en ellos. Sin embargo, solo 2 especies se han confirmado mediante transmisión experimental: *Haplaxius crudus* (van Duzee) en EE.UU. y Proutista moesta en India. ^(8,9)

En Cuba estudios previos identificaron los aislados estudiados pertenecientes al subgrupo 16SrIV-A con determinado grado de diversidad genética. ⁽⁴⁾ Respecto a posibles vectores, se identificaron a *Nymphocixia caribbea* y *H. crudus*, en base a su presencia predominante en los ecosiste-

mas cocoteros. ⁽¹⁰⁾ Sin embargo, aun hoy persiste la ausencia de evidencias científicas que avalen esta afirmación. Igualmente, las investigaciones realizadas de esta patología se han enfocado en el cocotero como cultivo principal afectado, por lo que existe un desconocimiento sobre otras especies vegetales que pudiesen estar involucradas en la mayor complejidad epidemiológica de este patosistema en nuestras condiciones.

Por lo anteriormente expuesto el presente trabajo tuvo como objetivos: a) caracterizar la diversidad de los fitoplasmas asociados a la sintomatología de amarillamiento letal detectada en ecosistemas cocoteros cubanos, b) caracterizar los fitoplasmas asociados a amarillamiento letal del cocotero, presentes en hospedantes alternativos y en insectos vectores potenciales y c) comprobar la transmisión de fitoplasmas asociados a amarillamiento letal del cocotero por los vectores potenciales identificados.

MÉTODOS

Se tomaron un total de 16 muestras de plantas (sintomáticas y asintomáticas) en diferentes regiones de Cuba, incluyendo Habana del Este (provincia Habana), Moronta, Sola, Santa Lucía y La Gloria (Provincia Camagüey) y Pílon (provincia Granma). Durante estos muestreos se observaron 15 plantas de *Pritchardia pacifica* en un jardín de ornamentales en áreas residenciales de Miramar. De estas se tomaron muestras de 1 planta mostrando síntomas de amarillamiento foliar y 4 plantas asintomáticas. Igualmente se colectaron individuos de insectos de mayor presencia, asociados a agrosistemas cocoteros en diferentes localidades de Camagüey y de Baracoa.

Ensayos de transmisión experimental

Se realizaron 2 ensayos de transmisión empleando individuos de *H. crudus* en ambos:

Ensayo 1: de 4 plántulas de *P. pacifica* se obtuvieron por germinación bajo condiciones de aislador; de estas plántulas 3 se colocaron individualmente bajo malla con la presencia de (10 a 15) insectos por planta. La plántula restante se mantuvo como control negativo no inoculado.

Ensayo 2: de 4 plántulas de cocotero (*Cocos nucifera*) se obtuvieron por germinación bajo condiciones de aislador; de estas plántulas 3 se colocaron individualmente bajo malla con la presencia de (10 a 15) insectos por planta. La última plántula se mantuvo como control negativo sin inoculación.

El estado de las plántulas se comprobó mediante PCR anidada para verificar la ausencia de fitoplasmas, previo a la inoculación. Los insectos se colectaron después de su muerte y se preservaron en etanol al 95 %, mientras que las plantas se

mantuvieron en aislador para monitoreo de aparición de síntomas. Las comprobaciones tanto de los insectos como de las plantas se realizaron por PCR al finalizar los experimentos.

Extracción de ADN y análisis moleculares

Cada muestra consistió en aserrín del tronco obtenido con el empleo de un taladro manual (para plantas adultas), nerviosa centrales foliares (para las plántulas) así como grupo de individuos (para los insectos). ⁽¹¹⁾ La extracción de ADN total se realizó a partir de 0,6 g a 1 g del tejido (para las plantas) y un grupo de 10 individuos (para los insectos) con los métodos CTAB o cloroformo-fenol. ^(12,13) A partir de los purificados se desarrollaron ensayos PCR en base a la amplificación del gen ribosómico 16S de fitoplasmas con los cebadores P1/P7 anidados con U3/U5, R16mR1/R16mF2 o R16F2n/R2 para detección generalista de fitoplasmas, y con los cebadores específicos para fitoplasmas del grupo 16SrIV, 16S503f/LY16Sr, LY16Sf/LY1623Sr o LY16Sf/LY1623Sr. ^(14,15,16,17,18,19,20) Adicionalmente, las muestras positivas con el sistema específico al grupo IV, se amplificaron para el gen *groEL* con sistema anidado con los cebadores *groELF1/R1* en la reacción directa y *groELF2/R2* en la anidada. ⁽²¹⁾ Se emplearon muestras positivas, con aislados del grupo IV-A procedentes de México y Jamaica, como controles positivos de amplificación. Posteriormente, se realizaron análisis de RFLP o RFLP *in silico* de los amplicones obtenidos y secuenciación de los mismos en ambas direcciones. ^(22,23)

Análisis filogenéticos

Se realizaron análisis filogenéticos con las secuencias 16S obtenidas en estos estudios y las informadas en muestras previamente, así como aislados de referencia obtenidos de la base de datos GenBank. ^(24,25,26) Los árboles filogenéticos se desarrollaron con el programa MEGA X ⁽²⁷⁾, empleando *Acholeplasma palmae* como raíz del árbol con 1000 simulaciones.

RESULTADOS

De las 16 plantas de cocotero muestreadas, 15 fueron sintomáticas. De estas últimas, 7 resultaron positivas para amplificación de ADN de fitoplasmas. El análisis de secuencia confirmó la identidad de los fitoplasmas detectados. Estos resultados indicaron la presencia de fitoplasmas de los grupos 16SrI, -VII y -XII, además del -IV.

Los aislados pertenecientes al grupo 16SrIV se agruparon en el subgrupo -A, lo cual fue reafirmado por los patrones de bandeo obtenidos para la región 16S con las enzimas *AluI* y *Tru1I* (figura 1, izquierda). En las mismas el análisis RFLP del gen *groEL* con la enzima *Tru1I* apoyó la identidad como fitoplasmas del 16SrIV-A en los aislados cubanos; sin embargo,

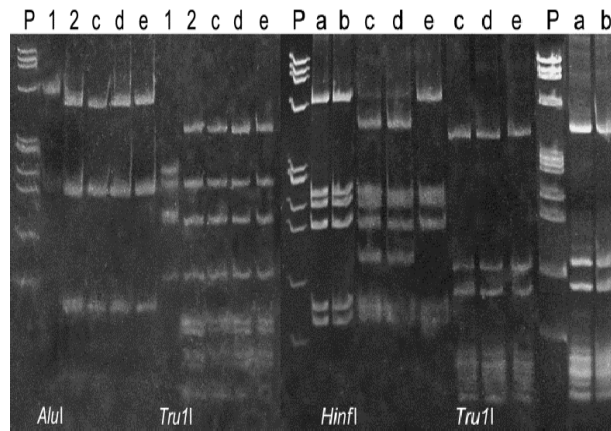


Fig. 1. RFLP de amplicones obtenidos con cebadores 16S503f/LY16Sr (izquierda) y groELF2/R2 (derecha) de las muestras de cocoteros con las enzimas nombradas en el borde inferior. Muestras de Cuba: muestras C7 (c), C13 (d) y 168 (e); muestras de México: 16SrIV-D (1) y 16SrIV-A (2); muestras de Jamaica: (a y b); P: marcador phiX174 digerido con HaeIII

el patrón obtenido con este marcador en dichos aislados tratados con la enzima *HinfI* permitió 2 subpoblaciones dentro de las poblaciones cubanas: unas similares a aislados de origen mexicano (muestras C7 y C13) mientras que los fitoplasmas detectados en la muestra C168 mostró patrón idéntico al de aislados provenientes de Jamaica (figura 1, derecha).

Con el empleo de los cebadores LY16Sf/LY16-23Sr (específicos al grupo IV) se obtuvo amplificación en la muestra la planta sintomática de *P. pacifica* así como en los individuos de la especie *Hortensia similis*, identificada acorde a la descripción de Dlabola and Novoa y de alta presencia en los muestreos realizados.⁽²⁸⁾ Los amplicones se clonaron y 4 clones para el insecto y 2 para la palma se purificaron y secuenciaron en ambos sentidos, junto a amplicones sin clonar. El fragmento RF2n/R2 se obtuvo usando el programa MEGA y una secuencia por aislado se depositó en la base de secuencias GenBank con los números de accesiones OL657103 (de *P. pacifica*) y OL657102 (de *H. similis*). Ambas secuencias mostraron el mayor porcentaje de similitud con secuencias de aislados de Candidatus *Phytoplasma palmae* incluyendo una secuencia previamente informada para un fitoplasma obtenido de cocotero cubano (número de accesión DQ645632). En el árbol filogenético, las secuencias se agruparon en el clado formado por varios aislados del continente americano (figura 2).

Los análisis RFLP mostraron que ambos patrones (clonados y no clonados), obtenidos del fitoplasma detectado en *H. similis* resultaron idénticos (coeficiente de similitud de 1) con el aislado LYJ-C8 de amarillamiento letal perteneciente al subgrupo 16SrIV-A (número de accesión AF498307), indicando que el fitoplasma detectado en este insecto puede ser

asignado a este subgrupo (figura 3). Sin embargo, la secuencia clonada del aislado encontrado en *P. pacifica* produjo un patrón *in silico* diferente con *AluI*, *HhaI* y *Sau3AI* (coeficiente de similitud de 0,88).

A pesar de ello, los análisis RFLP desarrollados sobre los amplicones directamente no confirmaron estas diferencias indicando, sin embargo, la presencia de un perfil idéntico para fitoplasma del subgrupo 16SrIV-A (figura 3).

En las pruebas de transmisión, solo 1 de las plántulas de cocotero del ensayo 2 manifestó amarillamiento foliar a los 10 meses postinoculación. La presencia de fitoplasmas se comprobó molecularmente con la amplificación positiva tanto para la planta sintomática como en el grupo de insectos empleado en su inoculación. Las restantes plántulas y grupos de insectos resultaron negativas. Ambas secuencias 16S obtenidas (una a partir de la planta y la otra a partir de los insectos) mostraron 100 % de similitud entre sí en los 1421 nucleótidos solapados, por lo que la secuencia consenso se depositó en la base de datos GenBank (número de accesión OR014303).

Esta secuencia mostró en análisis BLASTn un 99,86 % de identidad con el aislado de referencia de *Ca. P. palmae* (número de accesión U18747) así como con otros aislados del mismo grupo (16SrIV-A) incluyendo el clon mexicano Hc-3, obtenido a partir de extracto de *H. crudus* (número de accesión MT161605). A pesar de la pequeña diferencia observada en el perfil RFLP *in silico* con la enzima *Sau3AI*, respecto a la secuencia de referencia del subgrupo 16SrIV-A (aislado LYJ-C8, número de accesión AF498307), el coeficiente de similitud de 0,98 permitió incluir al aislado cubano detectado en dicho subgrupo. Estas observaciones se corroboraron en el

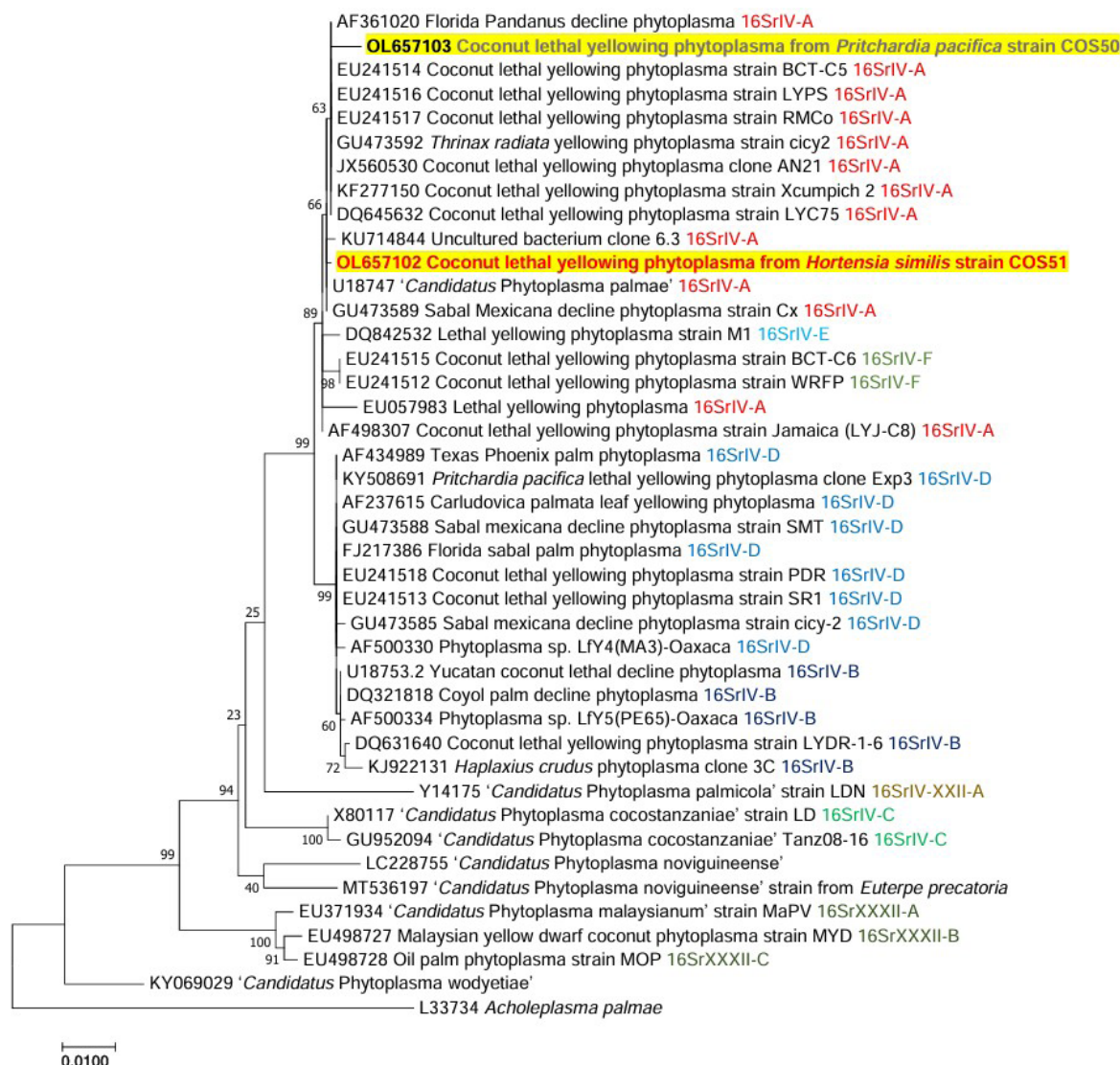


Fig. 2. Árbol filogenético del análisis de las secuencias parciales 16S del ADNr de fitoplasmas representativos del grupo asociado a la enfermedad LY (grupo 16SrIV) y otros fitoplasmas asociados con palmeras construido usando MEGA7 con el método Maximum-likelihood. Las secuencias obtenidas a partir de *Pritchardia pacifica* y *Hortensia similis* en el presente estudio marcada en amarillo

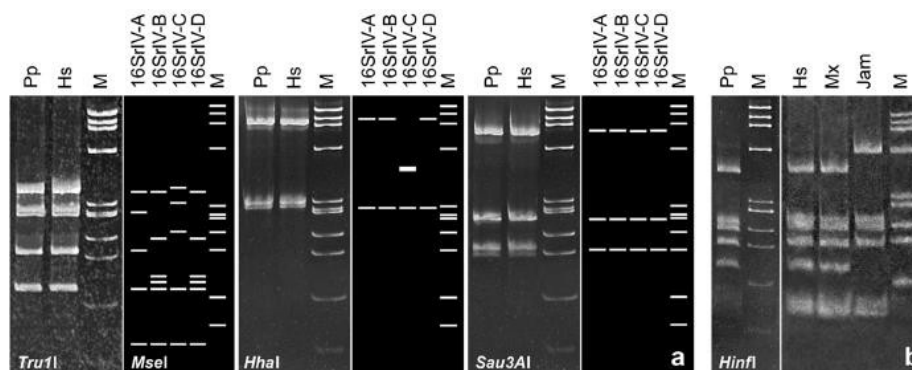


Fig. 3. Perfiles RFLP de a) amplicones R16F2n/R2 del fitoplasmas obtenido de *Pritchardia pacifica* comparado con los perfiles virtuales del *iPhy-Classifier* de secuencias pertenecientes a los subgrupos del 16SrIV con, a partir de la izquierda, TruI y MseI (virtual), HhaI y Sau3AI, respectivamente, Pp = *Pritchardia pacifica*; Hs = *Hortensia similis*; b) amplicones a partir de las mismas muestras y de los controles (Mx = fitoplasma asociado a LY en cocotero de México; Jam = fitoplasma asociado a LY en cocotero de Jamaica) digeridos con HinfI. M y MW = marcador PhiX174 digerido con HaeIII

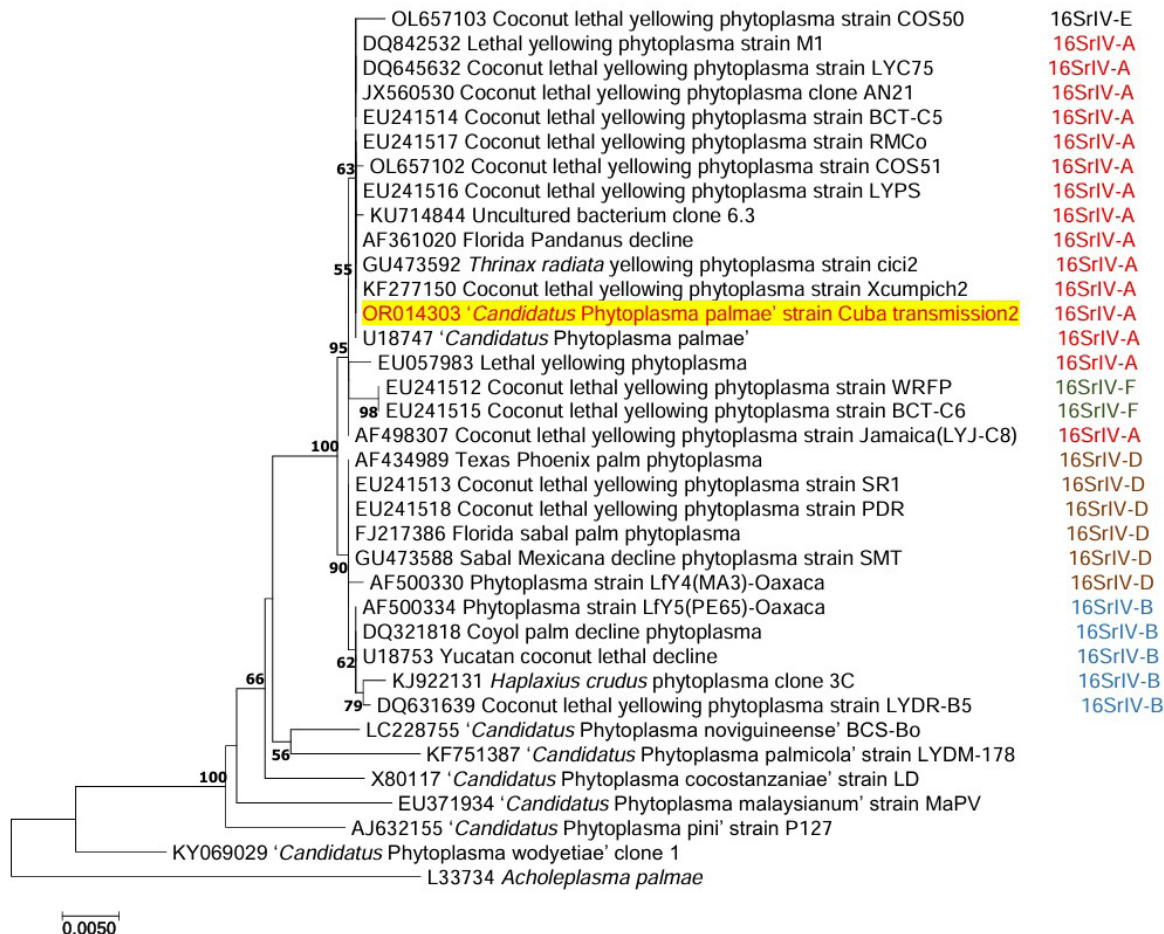


Fig. 4. Árbol filogenético derivado del análisis de las secuencias 16S de fitoplasmas seleccionados en el grupo ribosómico 16SrIV o infectando palmas. El aislado obtenido en este estudio se resaltó en rojo y amarillo

árbol filogenético (figura 4), donde el fitoplasma involucrado en la inoculación exitosa se agrupó con aislados de *Ca. P. palmiae* informados en el continente americano, incluyendo otros aislados cubanos previamente descritos.

DISCUSIÓN

En América, la enfermedad del amarillamiento letal del cocotero afectando cocotero (*Cocos nucifera*) y varias especies de palmas se asoció con fitoplasmas del grupo 16SrIV, principalmente subgrupos –A y –D. ⁽²⁹⁾ En estudios previos los fitoplasmas detectados en ecosistemas cocoteros cubanos se identificaron como pertenecientes al subgrupo IV-A. ⁽⁴⁾ En correspondencia con esta observación, en el presente muestreo se identificó este mismo subgrupo como el de mayor presencia en las muestras analizadas (5 de 7 muestras positivas). Sin embargo, el empleo de un nuevo esquema adicional con un marcador molecular menos conservado (i.e. el gen *groEL*) permitió diferenciar por primera vez los aislados en las poblacio-

nes cubanas de este subgrupo, acorde a su origen geográfico. Igualmente, se detectaron por primera vez aislados pertenecientes a otros grupos (16SrI, -VII y -XII) infectando palmas en Cuba, mostrando la misma sintomatología descrita para amarillamiento letal. Estos resultados son similares a lo informado en otras áreas productoras de coco infectadas. ⁽³⁰⁾

Esencialmente la epidemiología de las enfermedades transmitidas por insectos depende directamente de sus vectores. ⁽³¹⁾ La detección de hospedantes alternativos, así como de insectos potenciales constituyen elementos importantes en la epidemiología de la enfermedad. La detección de fitoplasmas pertenecientes al subgrupo 16SrIV-A en *H. similis* sugiere su potencial papel como vector de *Ca. P. palmae* en Cuba. Esta especie se informó positiva para fitoplasmas y consideró como vector potencial para fitoplasmas del grupo 16SrI infectando frijoles en Panamá. ⁽³²⁾ Por otra parte, la falta de consistencia de los perfiles RFLP de las secuencias 16S (clonada y sin clonar) sugiere la po-

sible infección mixta de poblaciones de *Ca. P. palmae* en *P. pacifica*, donde la presencia del perfil típico de 16SrIV-A en los amplicones apunta a la prevalencia de este genotipo en la planta. El patrón obtenido para el gen *groEL* tratado con la enzima *Hinfl* mostró similitud entre estos aislados y los pertenecientes a una de las subpoblaciones identificada en cocotero con este mismo sistema, evidenciando la similitud de los aislados involucrados.

Otro aspecto importante es la comprobación de los insectos vectores potenciales. En este sentido, se realizó la transmisión experimental exitosa de aislados de *Ca. P. palmae* mediante adultos de *H. crudus*, colectados en plantaciones sintomáticas de cocoteros, a plántulas sanas de este cultivo. Esta demostración confirma la seria amenaza que constituye la presencia de este insecto en los agroecosistemas cocoteros cubano como una vía natural de diseminar la enfermedad. ⁽¹⁰⁾

Conclusiones

Se ratificó la presencia predominante de fitoplasmas del grupo 16SrIV-A asociada a plantas de coco sintomáticas al amarillamiento letal del cocotero en ecosistemas cubanos. El empleo adicional del gen *groEL* permitió discriminar por primera vez 2 tipos de aislados, acorde a su origen geográfico, dentro de las poblaciones cubanas pertenecientes al subgrupo IV-A. Se detectaron por primera vez la ocurrencia de fitoplasmas de los grupos ribosomales 16SrI, -VII y -XII en cocoteros sintomáticos a la enfermedad en las áreas infectadas. Se identificó por primera vez a *Pritchardia pacifica* como hospedante vegetal alternativo de aislados de *Ca. P. palmae* en Cuba. Se identificó por primera vez a *Hortensia similis* como vector potencial de aislados de *Ca. P. palmae*. Se confirmó por primera vez a *Haplaxius crudus* como insecto vector de aislados de *Ca. P. palmae* a plántulas de cocotero en Cuba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Prades A, Salum UN, Pioch D. New era for the coconut sector: What prospects for research? *OCL*. 2016; 23(6): D607. Disponible en: <http://doi.org/10.1051/ocl/2016048>
- Cueto JR. Apuntes para una historia del cultivo del cocotero en Cuba I. Desde 1942 hasta 1959. Especial referencia a la región de Baracoa. *Monografiado*. 1986:15.
- Gurr GM, Johnson AC, Ash GJ *et al*. Coconut lethal yellowing diseases: a phytoplasmas threat to palms of global economic and social significance. *Fronti Plant Sci*. 2016;7:1521. Disponible en: <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.01521>
- Llauger R, Becker D, Cueto J, Peralta E, González V, Rodríguez M, *et al*. Detection and molecular characterization of phytoplasma associated with lethal yellowing disease of coconut palms in Cuba. *Journal of Phytopathology*. 2002;150:390-5. Disponible en: <http://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00758.x>
- Harrison NA, Helmick EE, Elliott ML. Lethal yellowing-type diseases of palms associated with phytoplasmas newly identified in Florida, USA. *Ann Appl Biol*. 2008;153:85-94. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00240.x>
- Harrison NA, Davis RE, Oropeza C, Helmick E, Narvaez M, Eden-Green S, *et al*. 'Candidatus Phytoplasma palmicola' a novel taxon associated with a lethal yellowing type disease (LYD) of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014;64:1890-9. Disponible en: <http://doi.org/10.1099/ijs.0.060053-0>
- Howard FW, Moore D, Gibling-Davis RM, Abad RG. The animal class Insecta and the plant family Palmae. In: *Insects on Palms*. CABI, USA; 2001:1-32p.
- Howard FW, Norris RC, Thomas DL. Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus* (homoptera: Cixiidae). *Trop Agric*. 1983;60:168-71.
- Rajan P. Transmission of coconut root (wilt) disease through plant hopper, *Proutista moesta* Westwood (Homoptera: Derbidae). *Pest manage Hortic. Ecosyst*. 2013;17:1-5.
- Llauger R, Alonso M, Fabre S, Gonzalez C, Julia JF, Luis M, *et al*. Current status of coconut lethal yellowing research in Cuba. XLVI Annual Meeting American Phytopathological Society, Cartagena, Colombia. September 12-16 (internet). 2006. Disponible en: <https://agritrop.cirad.fr/539077/>
- Tomlinson JA, Boonham N, Dickinson M. Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. *Plant Pathology*. 2010;59(3):456-71. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02233.x>
- Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 1980;8:4321-5. Disponible en: <http://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Prince JP, Davis RE, Wolf TK, Lee I-M, Mogen BD, Dally EL, *et al*. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*. 1993;83:1130-7.
- Deng S, Hiruki C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non culturable Mollicutes. *Journal Microbiology Methods*. 1991;14:53-61. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-D](http://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D)
- Schneider B, Seemuller E, Smart CD, Kirkpatrick BC. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*. Academic Press, USA; 1995:369-80 p. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/b978-012583805-5/50040-6>
- Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U, Seemuller E. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non-ribosomal DNA. *Phytopathology*. 1995;85:771-6.
- Gundersen DE, Lee I-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested- PCR assays using two universal primer pairs. *Fitopatologia Mediterranea*. 1996;35:144-51.
- Harrison N, Cordova I, Richardson P, Dibonito R. Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: *Current Advances in Coconut Biotechnology*. Kluwer Academic, The Netherlands; 1999:183-96 p. Disponible en: http://doi.org/10.1007/978-94-015-9283-3_13

19. Harrison NA, Womack M, Carpio ML. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasmas in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Dis*. 2002b;86(6):676-81. Disponible en: <http://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.676>
20. Harrison NA, Narváez M, Almeyda H *et al*. First report of group 16SrIV phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the pacific coast of Mexico. *New Dis Rep*. 2002c;5:1-3. Disponible en: <http://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00778.x>
21. Myrie W, Harrison N, Douglas L *et al*. Identification of lethal yellowing disease of palms associated with infection by subgroup 16SrIV-A phytoplasmas in Antigua, West Indies. *New Dis Rep*. 2014;29:12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.012>
22. Zhao Y, Wei W, Lee I-M, Shao J, Suo X, Davis RE. Construction of an interactive online phytoplasmas classification tool iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasmas group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009;59(10):2582-93. Disponible en: <http://doi.org/10.1099/ijs.0.010249-0>
23. Wei W, Lee I-M, Davis RE, Suo X, Zhao Y. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasmas 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008; 58(10):2368-77. Disponible en: <http://doi.org/10.1099/ijs.0.65868-0>
24. Bertaccini A, Satta E, Luis-Pantoja M, Paredes-Tomás C, Uneau Y, Myrie W. *Candidatus* Phytoplasma and *Candidatus* Liberibacter species detection in Citrus. *Phytopathogenic Mollicutes*. 2019;9(1):187-8. Disponible en: <http://doi.org/10.5958/2249-4677.2019.00094.X>
25. Luis-Pantoja M, Paredes-Tomás C, Uneau Y, Myrie W, Morillon R, Satta E, *et al*. Identification of *Candidatus* Phytoplasma species in huanglongbing infected citrus orchards in the Caribbean. *European Journal of Plant Pathology*. 2021;160:185-98. Disponible en: <http://doi.org/10.1007/s10658-021-02234-7>
26. Paredes-Tomás C, Satta E, Paltrinieri S, Oropeza-Salín C, Myrie W, Bertaccini A, Luis Pantoja M. *Candidatus* Phytoplasma species detection in coconut in Cuba. *Phytopathogenic Mollicutes*. 2019;9(1):191-2. Disponible en: <http://doi.org/10.5958/2249-4677.2019.00096.3>
27. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tanura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018;35(6):1547-9. Disponible en: <http://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
28. Dlabola J, Novoa N. Dos especies del género *Hadria Metcalf y Bruner*, 1936 (Homoptera: Auchenorrhyncha) y revisión de otras especies cubanas. Instituto de Zoología, Academia de Ciencias de Cuba. 1976.
29. Ntushello K, Harrison NA, Elliot ML. Palm phytoplasmas in the Caribbean basin. *Palms*. 2013;57(2):93-100.
30. Contaldo N, D'Amico G, Paltrinieri S, Diallo HA, Bertacini A, Arocha Rosete Y. Molecular and biological characterization of phytoplasmas from coconut palms affected by the lethal yellowing disease in Africa. *Microbiological Research*. 2019;223-5:51-7. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.011>
31. Johannesen J, Foissac X, Kehrli P, Maixner M. Impact of vector dispersal and host-plant fidelity on the dissemination of an emerging plant pathogen. *Plos ONE*. 2012;7:e51809.
32. Moreira-Carmona L, Villalobos-Muller W, Saborío-Rodríguez G, Garita-Salazar L, Castro-Robleda S, Romero-Cano J, Godoy-Cabrera C and Rivera- Herrero C. Avances en la investigación sobre un fitoplasma asociado al amachacamiento del frijol. In: Memoria Congreso Alianza Tecnológica para la agricultura con calidad; V Congreso Iberoamericano de Agroplasticultura; IV Congreso Nacional de Suelos y V Congreso Nacional de Fitopatología. Costa Rica. 2003:17-19 pp.

Recibido: 5/09/2025

Aprobado: 28/09/2025

Agradecimientos

Los autores desean agradecer profundamente a los técnicos del IIFT, Lázaro Martínez Mieres y Kristofer Mejías Power, así como a la Dr. Sc. Eleonora Satta y a la Samanta Paltrinieri (técnico de laboratorio) de UNIBO por su colaboración en la realización de este trabajo

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses entre ninguna de las partes asociadas.

Contribución de los autores

- Conceptualización: Camilo Paredes Tomás, Maritza Luis Pantoja, Assunta Bertaccini
- Adquisición de fondos: Assunta Bertaccini
- Investigación: Camilo Paredes Tomás, Maritza Luis Pantoja, Assunta Bertaccini, Jorge Luis Rodríguez Tapia, María Narváez, Francesco Pacini
- Metodología: Camilo Paredes Tomás, Maritza Luis Pantoja, Assunta Bertaccini, Jorge Luis Rodríguez Tapia, Carlos Oropeza Salín, Wayne Myrie
- Administración del proyecto: Camilo Paredes Tomás, Maritza Luis Pantoja, Assunta Bertaccini
- **Software:** Camilo Paredes Tomás, Assunta Bertaccini
- Visualización: Camilo Paredes Tomás, Maritza Luis Pantoja, Assunta Bertaccini
- Redacción-borrador original: Camilo Paredes Tomás
- Redacción-revisión y edición: Maritza Luis Pantoja, Assunta Bertaccini, Jorge Luis Rodríguez Tapia, Carlos Oropeza Salín, Wayne Myrie, María Narváez, Francesco Pacini

FinanciamientoS

Proyecto de colaboración en el área de sanidad vegetal: "Insect-borne prokaryote-associated diseases in tropical and subtropical perennial crops" (TROPICSAFE). Funding from European Union's Horizon 2020 research innovation program under the grant agreement No. 727459.

Cómo citar este artículo

Paredes Tomás C, Luis Pantoja M, Bertaccini A, Rodríguez Tapia JL, Oropeza Salín C, Myrie W, *et al*. Actualización de aspectos claves para la epidemiología del amarillamiento letal del cocotero en Cuba. *An Acad Cienc Cuba* [Internet] 2025 [citado en día, mes y año];15(3):e3162. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/3162>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin

permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2025.

