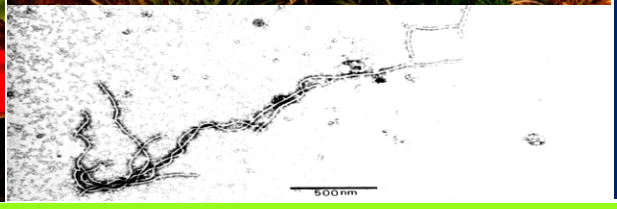
PROPUESTA A PREMIO NACIONAL
ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA
2017

EL COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA: BASES PARA EL ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO

Autor Principal: Lester Hernández Rodríguez
Otros autores: Pedro Luis Ramos González, Victoria Zamora Rodríguez, Lisela Carmona, William Villalobos, Ana Arruabarrena, Inés Peña Bárzaga, Maylín Rodríguez Rubial, Yasmary Rubio Fontanills

La Habana, 2017



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FRUTICULTURA TROPICAL
MINISTERIO DE LA AGRICULTURA

PROPUESTA A PREMIO NACIONAL

ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA

2017

EL COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA: BASES PARA EL ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO

Unidad ejecutora principal del resultado:

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical

Autor principal:

Lester Hernández Rodríguez

La Habana, 2017

PROPUESTA A PREMIO NACIONAL ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA 2017

I. PRESENTACIÓN DE LA PROPUESTA

Título: El complejo viral asociado a la marchitez de la piña en Cuba: bases para establecimiento de su manejo.

Unidad ejecutora principal: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT)

Autores principales: Lester Hernández Rodríguez[1]

Otros autores: Pedro Luis Ramos González[2▼], Victoria Zamora Rodríguez[1], Lisela Carmona[3], William Villalobos[3], Ana Arruabarrena[4], Inés Peña Bárzaga[1], Maylín Rodríguez Rubial[1], Yasmary Rubio Fontanills[5▼]. **Colaboradores**: 16.

Filiación: [1]Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba. [2]Instituto Biológico, Sao Paulo, Brasil. [3]Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de San José, Costa Rica. [4]Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Salto Grande, Salto, Uruguay. [5]Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas. ▼Filiación actual.

Autor para la correspondencia: Lester Hernández Rodríguez. IIFT, Ave. 7ma. No. 3005 e/30 y 32, Miramar, Playa, La Habana, CUBA, Tele fax: (53-7) 204-6794; Teléfono: 209-3585. fitopatologia@iift.cu, lesterhernandeziift@gmail.com.

I.1 Resumen

La enfermedad marchitez de la piña (MWP) está asociada a un complejo de ampelovirus [*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* al 5 (PMWaV-1 al -5)] (*Closteroviridae*) y badnavirus [*Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) y *Pineapple bacilliform ER virus* (PBERV) (*Caulimoviridae*)]. En Cuba, la presencia de PMWaV-2 se detectó en el 2007 en Ciego de Ávila, sin embargo se desconocen los datos sobre la diseminación de la MWP y la posible presencia de los otros virus involucrados. En la presente propuesta se describen los resultados del desarrollo de pruebas moleculares para el diagnóstico de cuatro de los virus asociados a la enfermedad, y una prospección para conocer la distribución y diversidad genética de los mismos. Para este trabajo se realizó una prospección en 24 fincas de 10 provincias y la Isla de la Juventud, durante 2009 a 2012, en la que se registraron los síntomas de MWP y se colectaron muestras para el diagnóstico de los ampelovirus y badnavirus a través de RT-PCR y PCR, respectivamente. Los resultados indicaron que la MWP tiene una amplia presencia en Cuba y sus síntomas característicos son enrojecimiento (en cv. 'Española roja' y 'Cayena lisa', no en 'MD-2'), necrosis y curvatura de las hojas hacia abajo y marchitez, con un patrón visual de agregación de las plantas enfermas. Se detectó por vez primera la presencia de PMWaV-1, PMWaV-3, PBCOV y ePBCOV en la cuenca del Caribe, y la infección por PMWaV-2 de la piña ratón (*Bromelia pinguin*), primer informe de esta planta como hospedante natural de ampelovirus. Además, se determinó la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, y PBCOV en todas las áreas prospectadas, y una alta asociación entre la presencia de PMWaV-2 y los síntomas de MWP. El presente trabajo describe la evaluación de un procedimiento para la purificación simultánea de mezclas de ARN y ADN vegetal para

ensayos de detección de ampelovirus y badnavirus por RT-PCR y Dot Blot, y PCR y RT-PCRq para otros agentes virales. Se expresaron en *Escherichia coli* y purificaron las proteínas de cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3, las cuales se utlizarán para desarrollar alternativas serológicas de diagnóstico. Los resultados presentados, a la vez que evidencian la necesidad de la implementación de una estrategia de la enfermedad marchitez de la piña en Cuba, ofrecen herramientas que contribuyen a su control mediante la producción de semillas libres de virus.

Problema que se ha resuelto de acuerdo con los objetivos del trabajo:

En Cuba, la enfermedad marchitez de la piña puede ocasionar pérdidas en el cultivo que llegan hasta el 40 % de los rendimientos. Investigaciones previas demostraron la presencia de partículas closterovirales y de PMWaV-2 en plantas de piña cv. 'Cayena lisa', de la Estación Experimental “Tomás Roig”, Ciego de Ávila (Borroto *et al*., 1998, 2007). Sin embargo, se desconoce la presencia del complejo viral asociado a la enfermedad en las plantaciones comerciales de Cuba y la diseminación de la enfermedad. Asimismo, no se conoce cuál o cuáles agente(s) viral(es) están relacionados con el desarrollo de la MWP en el país.

Resultados:

- La identificación por primera vez en Cuba y en la Cuenca del Caribe, de dos nuevos ampelovirus para la región: *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* (PMWaV-1) y PMWaV-3 (*Closteroviridae*: *Ampelovirus*).
- La detección por primera vez en América de *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) (*Caulimoviridae*: *Badnavirus*).
- La identificación por primera vez en América de una secuencia de endogenous Pineapple bacilliform CO virus (PBCOV) en plantas de piña.
- Se demostró por primera vez que la piña ratón (*Bromelia pinguin*), es un hospedante natural para PMWaV-2.
- Se estableció por primera vez en Cuba la incidencia y amplia presencia de los síntomas de MWP en las áreas comerciales de piña.
- Se asoció por primera vez en Cuba la infección de PMWaV-2 con el desarrollo de los síntomas de MWP.
- Se implementó un servicio científico-técnico para la certificación de vitroplantas de piña libres de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 que ha permitido la exportación de estos propágulos a otros países, con el consiguiente ingreso económico por exportación.
- Se evaluó un método para la extracción de mezclas de ADN y ARN con calidad suficiente para ensayos de RT-PCR, PCR, PCRq y Dot Blot.
- Se obtuvieron las proteínas de cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 para la obtención de inmunoreactivos que posibiliten el desarrollo de inmunodiagnósticos más baratos que los métodos de RT-PCR.

II. APORTE CIENTÍFICO DE LOS AUTORES

Aporte científico personal de cada autor al resultado:

Nombre y apellidos (% participación)	**Aporte**
MSc. Lester Hernández Rodríguez (30 %)[1]	Dirigió como autor principal y líder de los proyectos en los que se ejecutaron las investigaciones el diseño y la ejecución de los experimentos, así como el análisis de los datos obtenidos. Trabajó en las prospecciones, el procesamiento de las muestras y la caracterización molecular de los virus detectados. Presentó todos los resultados derivados del proyecto en varios eventos nacionales e internacionales. Escribió como primer autor todas las publicaciones nacionales y una internacional. Presentó nueve resultados al Consejo Científico del IIFT y al Departamento de Ciencia y Técnica del MINAG, los cuales se aprobaron como Resultados Científicos de la Investigación e Introducción Directa. Fue tutor de dos tesis en opción al grado de Licenciatura en Microbiología, autor de una tesis de Maestría en Biología Vegetal, y predefendió satisfactoriamente la tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, todas de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana, desarrolladas como parte del proyecto. Diseñó, colaboró con la contratación y ejecutó el servicio científico-técnico de Certificación de Material de Propagación de Piña.
Dr. Pedro Luis Ramos González (20 %)[2]	Participó en el diseño y la ejecución de los experimentos así como el análisis de los datos obtenidos. Trabajó en las prospecciones, procesamiento de las muestras, y caracterización molecular de los virus detectados durante la ejecución del proyecto. Participó en el diseño y preparación de los trabajos presentados en varios eventos nacionales e internacionales. Colaboró en todas las publicaciones nacionales e internacionales derivadas de esta investigación y en la preparación de siete trabajos para la presentación al Consejo Científico del IIFT y al Departamento de Ciencia y Técnica del MINAG, aprobados como Resultados Científicos de la Investigación. Fue asesor de una de las tesis en opción al grado de Licenciatura en Microbiología, tutor de la tesis de Maestría en Biología Vegetal, de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana.
Ing. Victoria Zamora Rodríguez (9 %)[1]	Mantuvo el banco de plantas de piña *in vitro* que constituyeron los controles negativos de todos los ensayos de diagnóstico. Colaboró en la escritura de las publicaciones y resultados derivados de esta investigación.
MSc. Lisela Carmona (9 %)[3]	Participó en el diseño y la ejecución de los experimentos y el análisis de los datos obtenidos en la expresión heteróloga en *Escherichia coli* de las proteínas de cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3. Colaboró en la consecución del financiamiento necesario para la ejecución de esta tarea.
Ing. William	Participó en el diseño y la ejecución de los experimentos así como el

Villalobos (9 %)[3]	análisis de los datos obtenidos en la expresión heteróloga en *Escherichia coli* de las proteínas de cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3. Colaboró en la consecución del financiamiento necesario para la ejecución de esta tarea. Diseñó y ejecutó las tareas necesarias para la obtención de los anticuerpos específicos para la detección de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 a partir de péptidos producidos en *Escherichia coli*.
MSc. Ana Arruabarrena (8 %)[4]	Ejecutó y colaboró como autor principal en conjunto con Lester Hernández los ensayos realizados para la evaluación del método de extracción de ARN y ADN, su publicación y la introducción de sus resultados.
MSc. Inés Peña Bárzaga (5 %)[1]	Participó en las prospecciones para la colecta de muestras durante la prospección. Colaboró con la escritura de las publicaciones, informes y demás recursos para la socialización de los resultados.
MSc. Maylín Rodríguez Rubial (5 %)[1]	Participó en el procesamiento de las muestras durante la ejecución de los experimentos y la caracterización molecular de los aislados virales. Desarrolló como parte del proyecto su tesis en opción al grado de Licenciada en Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana titulada: "*Caracterización de ampelovirus asociados a la marchitez de la piña en la Isla de la Juventud"*.
Lic. Yasmary Rubio Fontanills (5 %)[5]	Participó en el procesamiento de las muestras durante la ejecución de los experimentos como parte del proyecto su tesis en opción al grado de Licenciada en Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana titulada: "*Expresión recombinante de la proteína de cápside de Pineapple mealybug wilt associated virus-1, -2 y -3 en Escherichia coli"*.

Colaboradores: Yilian Llanes Alvarez[1], Luiz Pérez Vicente[6], Lelurlys Nápoles Borrero[7], Oscar Vitalio Concepción Laffitte[7], Lochy Batista Le Riverend[1], Miguel Ramos Leal[1], Elisa Javer Higginson[6], Gabriel García García[1], Juana María Pérez Castro[1], Alba M. Peralta Martin[1], Sergio Lázaro Mieres[1], Fernando Rivas[4], Ana Bertalmio[4], María José Benitez-Galeano[8], Mario Giambiasi[4], Rodney Colina[8].

Filiación: [1]Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba. [2▼]Instituto Biologico, Sao Paulo, Brazil. [3]Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de San José, Costa Rica. [4]Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Salto Grande, Salto, Uruguay.[5▼]Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas. [6]Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, Cuba. [7]Centro de Bioplantas, UNICA. Carretera a Morón, km 9, Ciego de Ávila, Cuba. [8]Laboratorio de Virología Molecular, Centro Universitario Regional Noroeste (CENUR Noroeste), Universidad de la República, Salto, Uruguay. ▼Filiación actual

Acreditación de la introducción del resultado y su impacto:
Los resultados presentados en el documento resultaron de la ejecución de proyectos nacionales e internacionales liderados por el IIFT, con la colaboración de investigadores nacionales y extranjeros de reconocido prestigio internacional. Su importancia es acreditada

por el Ministerio de la Agricultura y el Grupo Empresarial Agrícola, como principales usuarios de los resultados obtenidos en los proyectos (Anexo 10). La propuesta esta avalada por las principales bases productivas donde los resultados de la propuesta se generalizaron (Empresa Agroindustrial Enrique Troncoso, Pinar del Río, la Empresa Agroindustrial Ceballos, Ciego de Ávila) y la Delegación Provincial de la Agricultura de Ciego de Ávila. También reconocen este trabajo el Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV), el Instituto Nacional de investigaciones en Sanidad Vegetal (INISAV) y el Consejo Científico del IIFT. Como entidades extranjeras, avalan esta propuesta la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria, EMBRAPA Mandioca y Fruticultura, Brasil, el Grupo de Trabajo Internacional de la Piña de la Sociedad Internacional en Ciencias Hortícolas (ISHS, del inglés International Society in Horticultural Sciencies), el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de San José, Costa Rica, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Uruguay, y el Departamento para la Implementación de Sistemas de Producción y Transformación Tropical (PERSYST), CIRAD-UPR GECO Sistemas bananeros, piña y plátano de la Estación de Bassin Plat, Islas reunión, Francia. Se obtuvieron nueve Resultados de la Investigación Científica y dos Introducciones Directas.

Originalidad e impacto científico:

En este trabajo se realizó por primera vez en Cuba, y en la Cuenca del Caribe, la identificación de dos nuevos ampelovirus para la región: *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* (PMWaV-1) y PMWaV-3 (*Closteroviridae*: *Ampelovirus*). Se detectó por primera vez en América *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) (*Caulimoviridae*: *Badnavirus*). Asimismo, se demostró por primera vez en América la presencia de secuencias de endogenous Pineapple bacilliform CO virus (PBCOV) insertadas en el genoma de plantas de piña. Se informó por primera vez que la piña ratón (*Bromelia pinguin*), es un hospedante natural para PMWaV-2. Se estableció por primera vez en Cuba la incidencia y amplia presencia de los síntomas de la enfermedad marchitez de la piña (MWP) en las áreas comerciales de este frutal. Se asoció por primera vez en el país la infección de PMWaV-2 con el desarrollo de los síntomas de MWP. Se obtuvieron un total de 16 nuevas secuencias de aislados cubanos de los tres ampelovirus estudiados (cuatro de PMWaV-1, ocho de PMWaV-2 y cuatro de PMWaV-3), de ellas, ocho son del gen *hsp70h* y ocho del gen *cp*, cuatro secuencias del dominio RT/RNasaH de cuatro aislados cubanos de PBCOV y una secuencia de ePBCOV. Todas las secuencias se depositaron en la base de datos GenBank y el análisis de las mismas brindó nuevos datos sobre la distribución mundial de estos agentes, y la epifitiología de estas dos familias virales (*Closteroviridae* y *Caulimoviridae*) en la región y los análisis filogenéticos refuerzan las divisiones en géneros establecidas en las dos familias a las cuales pertenecen estos agentes virales. El método de extracción de ácidos nucleicos evaluado permitió la detección de los ampelovirus y badnavirus en un mismo extracto de ácidos nucleicos de plantas coinfectadas por PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV. Los resultados se publicaron en las revistas internacionales *New disease Report* (2), *Journal of Virological Methods* (1) y *Crop Protection* (1), así como en las revistas nacionales Centro Agrícola (1) y Citrifrut (4). Además, se incluyeron en dos Premios Ramales del Ministerio de la Agricultura (2011 y 2015) y se presentaron en 12 eventos nacionales e internacionales. Durante la ejecución de esta investigación se discutieron dos tesis Licenciatura en Microbiología, una tesis de Maestría en Biología Vegetal y una de Doctor en Ciencias Biológicas, todas presentadas en la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana (Anexo 11).

Impacto social:
El trabajo tuvo un impacto social directo en la formación de recursos humanos por medio de acciones de capacitación y divulgación de los conocimientos relacionados con la enfermedad marchitez de la piña en Cuba. Estas acciones se socializaron mediante la coordinación y ejecución de cursos, talleres y servicios científicos técnicos en las empresas frutícolas y productores del sector privado. De esta forma, se fomentó y potenció el conocimiento científico-técnico de la enfermedad MWP y su vector, lo cual repercutirá en un mejor manejo del cultivo, para lograr la sostenibilidad de este renglón económico importante para nuestro país. La industria piñera permite la subsistencia de alrededor de 5 mil personas vinculadas a esta agroindustria, y ha propiciado el desarrollo de una infraestructura en la cual habitan los trabajadores asociados a este cultivo. La definición de los conocimientos básicos para la implementación de la estrategia de manejo de la enfermedad marchitez de la piña en Cuba contribuirá a la supervivencia del cultivo de este frutal, y a la conservación de estas fuentes de empleo.

Impacto ambiental:
La enfermedad marchitez de la piña afecta la producción de este frutal y el agroecosistema donde se desarrollan sus plantaciones, tanto por la disminución en los rendimientos de este frutal, como por provocar cultivos debilitados que son dañados por otros patógenos oportunistas. Las metodologías de diagnóstico optimizadas para la detección de los virus asociados a la enfermedad, constituyen herramientas indispensables para los programas de erradicación selectiva de plantas enfermas que permiten prolongar la vida útil de las plantaciones y preservar el agroecosistema frutícola. El método de extracción de mezclas de ADN y ARN sustituyó al que se utilizaba en el laboratorio a base de compuestos orgánicos agresivos al medio ambiente, y permitió la detección de los ampelovirus y badnavirus en un mismo extracto de ácidos nucleicos de plantas coinfectadas por PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV. El establecimiento de un Sistema de Producción de Material de Propagación Certificado de Piña contribuirá a disminuir la diseminación del complejo de virus asociados a la enfermedad, incrementar los rendimientos de este frutal, y aumentar la sostenibilidad y desarrollo del cultivo de la piña en Cuba.

Impacto económico:
Los conocimientos y metodologías generados en este trabajo aportaron elementos y herramientas para la implementación de una estrategia primaria de manejo de la enfermedad marchitez de la piña en Cuba. Por primera vez en Cuba se obtuvieron metodologías para el diagnóstico molecular de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, badnavirus en general en el cultivo de la piña, y un método específico para PBCOV, las cuales son útiles para programas de manejo y vigilancia fitosanitaria de estos agentes virales. Se evaluó el método de RT-PCR-HSP70h para el diagnóstico de PMWaV-2, cuyos parámetros de desempeño mostraron que es adecuado para su utilización en los programas de certificación del material de propagación. Estas metodologías se utilizaron para implementar un servicio científico-técnico en el IIFT para la certificación de vitroplantas de piña libres de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3, contratado por el Centro de Bioplantas de Ciego de Ávila, y que ha permitido la exportación de vitroplantas de piña cv. 'MD-2' hacia otros países. Se evaluó un método para la obtención de extractos de ADN y ARN con un protocolo de fácil manipulación, y reactivos químicos no agresivos con el medio ambiente y más económico, con el objetivo de la disminución del costo

por reacción del servicio de certificación. El estudio aportó información sobre la presencia de los virus y la MWP en las tres regiones de Cuba, así como la incidencia de la enfermedad. Como otro producto del trabajo, se purificaron las proteínas de cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3, obtenidas mediante la expresión heteróloga en *Escherichia coli*, antígenos que permitirán la implementación de inmunodiagnósticos los cuales abaratarán la certificación del material de propagación. En general, estos resultados contribuyen a sostener una industria que proporciona empleo a una cantidad importante de personas, e ingresos tanto por la exportación de frutas frescas a mercados europeos, como por los productos procesados.

Publicaciones:

Año	Cita
	Grupo I
2010	**Hernández, L.**, Ramos, P.L., Rodríguez, M., Peña, I., Pérez, J. M. (2010): First report of *Pineapple mealybug wilt associated virus*-3 infecting pineapple in Cuba. **New Disease Reports** 22: 18. [http://dx.doi:10.5197/j.2044-0588.2010.022.018]. Citada por tres publicaciones.
2013	**Hernández-Rodríguez, L.** y Ramos-González, P. L., Garcia-Garcia, G., Higginson, E. J., Zamora-Rodriguez, V. (2013): First report of Pineapple bacilliform comosus virus (PBCoV) and endogenous Pineapple pararetrovirus-1 (ePPRV-1) in pineapple plants in Cuba. **New Disease Reports** 28: 2. [http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2013.028.002]. Citada por tres publicaciones.
2014	**Hernández-Rodríguez, L.** y Ramos-González, P. L., Garcia-Garcia, G., Zamora, V., Peralta-Martin, A.M., Peña, I., Perez, J. M., Ferriol, X. (2014): Geographic distribution of mealybug wilt disease of pineapple and genetic diversity of viruses infecting pineapple in Cuba. **Crop Protection** 65: 43-50. [http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.07.003]. **Factor de Impacto (5 años hasta 2016): 1,936**. Citada en un libro, y cuatro publicaciones.
2016	Arruabarrena, A., Benítez-Galeano, M. J., Giambiasi, M., Bertalmío, A., Colina, R., **Hernández-Rodríguez, L.** Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection. 2016. **Journal of Virological Methods** 237: 14–17. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.011].. **Factor de Impacto (5 años hasta 2016): 1,632**. Citada por una publicación.
	Grupo II
2017	**Lester Hernández-Rodríguez,** Lelurlys Nápoles Borrero, Luis Pérez Vicente, Oscar Vitalio Concepción Laffitte, Mariela Cid Ruiz, Yilian Alvares Llanes, Victoria Zamora Rodríguez. Infección de *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1*, *2* y *3* en plantas de piña, híbrido 'MD-2' en Ciego de Ávila. 2017. **Revista Centro Agrícola** 44 (2): 52-60.
	Grupo IV
2009	**Hernández, L.**, Peña, I. (2009): La marchitez de la piña producida por cochinillas, ¿un problema complejo o un complejo de problemas? **CitriFrut** 26(1): 22-28.
2010	**Hernández, L**., Ramos, P. L., Rodríguez, M., Zamora, V., Peña, I., y Pérez, J. M. (2010): Detección de ampelovirus asociados a la enfermedad de la marchitez de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en la Isla de la Juventud, Cuba. **CitriFrut** 27(1):39-46. Citado por tres publicaciones.

2011 **Hernández-Rodríguez, L.** y Ramos-González, P. L. (2011): La marchitez de la piña: una enfermedad asociada a virus. **CitriFrut** 28(1): 66-67. Citado por una publicación

2013 **Hernández-Rodríguez, L.** y Ramos-González, P. L., Garcia-Garcia, G., Zamora, V., Peña, I., Pérez, J. M., Ferriol, X. (2013): Diseminación de la enfermedad marchitez de la piña (Ananas comosus (L.) Merr.) en plantaciones comerciales de Cuba. **CitriFrut** 30(2): 43-54. Citado por una publicación.

Eventos nacionales e internacionales:

Año	Evento, título del trabajo y autores
2010	**IX Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal.** Santa Clara, Cuba. *First report of Pineapple mealybug associated virus-3 infecting pineapple in Cuba.* (Autor: Lester Hernández Rodríguez). **43 Congreso Brasileño de Fitopatología.** 15-19 de agosto, 2010. Cuiabá, Brazil. *La marchitez de la piña en Cuba: distribución y caracterización de los virus asociados.* (Autor: Lester Hernández Rodríguez). **III Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical**. La Habana, Cuba, 26-30 octubre 2010: *Los ampelovirus y la enfermedad marchitez de la piña en Cuba.* (Autor: Lester Hernández Rodríguez).
2011	**Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA 2011**. La Habana, Cuba, del 3 al 6 de mayo de 2011. *Distribución de Pineapple mealybug wilt-associated virus-1 en el cultivo de la piña en Cuba*. (Autor: Lester Hernández Rodríguez). **Congreso Internacional BIOTECNOLOGÌA HABANA 2011**. La Habana, Cuba. Del 28 de noviembre al 3 de diciembre de 2011. *Diversidad de virus asociados a la enfermedad marchitez de la piña en Cuba.* (Autor: Lester Hernández Rodríguez).
2012	**VIII Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química. V Simposio de Bioquímica y Biología Molecular.** La Habana, Cuba: *Diversidad viral asociada al cultivo de la piña (Ananas comosus (L.) Merr.) en Cuba.* (Autor: Lester Hernández Rodríguez).
2013	**IV Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical, ¨Fruticultura 2013¨. Mayabeque, Cuba:** *La enfermedad marchitez de la piña en Cuba: evidencias de la necesidad de un sistema de producción de material certificado para garantizar la sostenibilidad del cultivo de este frutal en el país.* (Autor: Lester Hernández Rodríguez).
2014	**VII Seminario Internacional de Sanidad Vegetal. 7-11 de abril de 2014 en La Habana, Cuba:** *Distribución y caracterización de badnavirus en plantaciones comerciales de piña en Cuba*. *(Autor: Lester Hernández Rodríguez).* *La etiología de la marchitez de la piña, caracterización de la enfermedad en Cuba*. (Autor: Lester Hernández Rodríguez).
2015	**IX Congreso de Ciencias Químicas, Tecnología e Innovación. QUIMICUBA, 2015. La Habana, Cuba:** *Expresión recombinante de la proteína de cápside de Pineapple mealybug wilt associated virus-1, -2 y -3 en Escherichia coli*. (Autor: Lester Hernández Rodríguez).
2017	**VIII Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal 2017, La Habana, Cuba.** *Infección de Pineapple mealybug wilt-associated virus-1, -2 y -3 en plantas sintomáticas y asintomáticas de piña del híbrido 'MD-2' en Ciego de Ávila.* (Autor:

Lester Hernández Rodríguez).

Tesis defendidas:

Año	Título, categoría de la tesis, autor y tutor
2010	*Caracterización de ampelovirus asociados a la marchitez de la piña en la Isla de la Juventud*. Tesis en opción del grado de Licenciado en Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. (Autor: Maylin Rodríguez Rubial, Tutor: Lic. Lester Hernández Rodríguez).
2012	*Diversidad viral asociada al cultivo de la piña (Ananas comosus (L.) Merr.) en Cuba*. Maestría Biología Vegetal, mención Biotecnología Vegetal. (Autor: Lester Hernández Rodríguez, Tutor: Dr. Pedro Luis Ramos González)
2014	*Expresión recombinante de la proteina de cápside de Pineapple mealybug wilt associated virus-1, -2 y -3 en Escherichia coli*. Tesis en opción del grado de Licenciado en Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. (Autor: Yasmary Rubio Fontanills, Tutor: MSc. Lester Hernández Rodríguez).
2017	*Complejo viral asociado a la enfermedad marchitez de la piña en Cuba.* Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. (Autor: MSc. Lester Hernández Rodríguez, Tutores: Dra. Lochy Batista Le Riverend y Dr. Miguel Ramos Leal). Aprobada en predefensa (29 de enero de 2017) y a defender en diciembre 2017.

Premios recibidos:

Año	Título, categoría del premio y autores
2011	**PREMIO RAMAL DEL MINISTERIO DE LA AGRICULTURA DE CUBA A LA INVESTIGACIÓN 2011**. Diversidad de virus asociados a la enfermedad marchitez de la piña en Cuba. (Autor: Lester Hernández Rodríguez).
2015	**PREMIO RAMAL DEL MINISTERIO DE LA AGRICULTURA DE CUBA A LA INVESTIGACIÓN 2015.** ¨Desarrollo de prospecciones, herramientas de diagnóstico y estudios de caracterización de plagas cuarentenarias y reglamentadas en los frutales de mayor importancia económica en Cuba¨. (Autor: Lester Hernández Rodríguez)

Resultados de la Investigación Científica:

Año	Título, Resultado Científico para la Investigación o Introducción Directa, código y autores
2009	Implementación de un método para el diagnóstico del *Pineapple mealybug wilt-associated virus-2* (PMWaV-2) en extractos de RNA de piña. Resultado Científico para la Investigación (6RI372). ***Lester Hernández***, Pedro Luís Ramos González, Maylin Rodríguez Rubial, Inés Peña Bárzaga, Juana María Pérez. Metodología para la detección mediante RT-PCR de *Pineapple mealybug wilt-associated virus-3*. Resultado Científico para la Investigación (6RI373). ***Lester Hernández***, Pedro Luís Ramos González, Maylin Rodríguez Rubial, Inés Peña Bárzaga, Juana María Pérez. Primer informe de la presencia del *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-3 (PMWaV-3) en plantaciones de piña en Cuba. Resultado Científico para la

Investigación (6RI374). ***Lester Hernández***, Pedro Luís Ramos González, Maylin Rodríguez Rubial, Inés Peña Bárzaga, Juana María Pérez.

2010 Establecimiento de un método para la detección por RT-PCR para *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* (PMWaV-1) y primer informe del virus en plantaciones de piña de Cuba. Resultado Científico para la Investigación (6RI389). **Lester Hernández**, Pedro Luis Ramos González, Inés Peña Bárzaga, Victoria Zamora, Juana María Pérez.

2011 Aislamiento, clonaje y caracterización del gen que codifica para la proteína de la cápside (CP) de los virus *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1, 2 y 3 (PMWaV-1, -2 y -3). Resultado Científico para la Investigación (6RI411). **Lester Hernández-Rodríguez**, Pedro Luis Ramos-González, Gabriel García García, Inés Peña Bárzaga, Victoria Zamora, Juana María Pérez.

Primer informe de la presencia de badnavirus (familia *Caulimoviridae*) en plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) de Cuba. Implementación de herramientas moleculares para su diagnóstico. Resultado Científico para la Investigación (6RI412). L**ester Hernández-Rodríguez**, Pedro Luis Ramos-González, Gabriel García García, Inés Peña Bárzaga, Victoria Zamora, Juana María Pérez.

La piña ratón (*Bromelia pinguiin* L.), un nuevo hospedero alternativo para *Pineapple mealybug wilt-associated virus-2* (PMWaV-2). Resultado Científico para la Investigación (6RI413). **Lester Hernández-Rodríguez**, Pedro Luis Ramos-González, Gabriel García García, Inés Peña Bárzaga, Victoria Zamora, Juana María Pérez**.**

2014 Expresión recombinante y purificación de la proteína de cápside de *Pineapple mealybug wilt associated virus*-1, -2 y -3 en *Escherichia coli"*. Resultado Científico para la Investigación (6RI458). **Lester Hernández-Rodríguez**, Yasmary Rubio Fontanills, Inés Peña Bárzaga, Victoria Zamora, Juana María Pérez y Xenia Ferriol Marchena.

2015 Desarrollo de prospecciones, herramientas de diagnóstico y estudios de caracterización de plagas cuarentenarias y reglamentadas en los frutales de mayor importancia económica en Cuba. Resultado Científico para la Investigación (6RI480). **Lester Hernández-Rodríguez**, Inés Peña Bárzaga, Xenia Ferriol Marchena, Edel Pérez-López, Maritza Luis Pantoja, Camilo Paredes Tomás, Ronal Pacheco Sanchez, María Bárbara Lugo, Ana Margarita Manzano, Daylé López-Hernández.

2017 Implementación de un protocolo simple y asequible para aislar los ácidos nucleícos totales de la planta para la detección de virus de ARN y ADN. Introducción Directa (en proceso). **Lester Hernández Rodríguez**, Ana Arruabarrena, María José Benítez-Galeano, Mario Giambiasi, Ana Bertalmío, Rodney Colina.

Implementación de un servicio científico-técnico para la certificación de material de propagación de la piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.] libre de *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1*, *2* y *3* (PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3). Introducción Directa (en proceso). **Lester Hernández Rodríguez**, Victoria Zamora Rodríguez, Yilian Llanes Alvarez, Inés Peña Bárzaga.

III. ÍNDICE

I. PRESENTACIÓN DE LA PROPUESTA I
I.1 RESUMEN I
II. APORTE CIENTÍFICO DE LOS AUTORES III
III. ÍNDICE 1
IV. COMUNICACIÓN CORTA 3
IV.1 INTRODUCCIÓN 3
IV.2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 9
V. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICO-TÉCNICA DE LOS RESULTADOS 10
V.1 INTRODUCCIÓN 10
V.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 11
V.2.1 Caracterización de la enfermedad marchitez de la piña y su incidencia en plantaciones de este cultivo en Cuba 11
V.2.2 Identificación de los ampelovirus PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en los ecosistemas productivos de piña prospectados 21
V.2.2.1 Detección de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 mediante RT-PCR-HSP70h 22
V.2.2.2 Caracterización molecular de aislados de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 25
V.2.2.3 Análisis de las secuencias de los amplicones obtenidos 27
V.2.3 Caracterización de badnavirus en las áreas de piña visitadas 35
V.2.3.2 Diagnóstico de PBCOV por hibridación de ácidos nucleicos no radioactiva 43
V.2.4 Relación de los agentes virales detectados con el desarrollo de síntomas de la marchitez de la piña 46
V.2.4.1 Especie viral asociada a los síntomas de MWP 48
V.2.5 Evaluación de un método de extracción de mezclas de los ácidos nucleicos ADN y ARN que permita la detección simultanea de ampelovirus y badnavirus 55
V.2.6 Purificación de las proteínas de cápside de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 expresadas de forma heteróloga en Escherichia coli 58
V.2.6.1 Expresión de forma recombinante las proteínas de cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en *E. coli* 58
V.2.6.2 Purificación de la cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 61
V.2.6.3 Escalado de la purificación 63
V.2.7 Discusión final 64
V.2.7.1 La marchitez de la piña en Cuba ¿necesidad de un cambio en la perspectiva de su manejo? 64
V.3 CONCLUSIONES 68
V.4 RECOMENDACIONES 68
V.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70
ANEXOS 80
ANEXO 1. DIAGRAMA DE LOS PLASMIDIOS PGEM®-T VECTOR, PGEM®-T EASY VECTOR (PROMEGA) Y PQE-30 (QIAGEN) 80
ANEXO 2. NÚMERO DE ACCESIÓN DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LOS VIRUS UTILIZADAS EN LOS ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE PMWAV-1, PMWAV-2 Y PMWAV-3 Y MIEMBROS DE LA FAMILIA *CAULIMOVIRIDAE* RECUPERADAS DE LA BASE DE DATOS GENBANK. 81
ANEXO 3. NÚMERO DE ACCESIÓN DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LOS VIRUS UTILIZADAS EN LOS ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE LOS AISLADOS DE BADNAVIRUS Y OTROS DE LA FAMILIA CAULIMOVIRIDAE RECUPERADAS DE LA BASE DE DATOS GENBANK. 82
ANEXO 4. CÁLCULO Y EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS USADOS PARA LA VALIDACIÓN DE TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y/O DIAGNÓSTICO 83

ANEXO 5. INFORMACIÓN DEL ESTADO SANITARIO Y EL DIAGNÓSTICO DE PMWAV-1, PMWAV-2, PMWAV-3 Y PBCOV DE LAS 144 MUESTRAS COLECTADAS EN LAS PROSPECCIONES..... 84
ANEXO 6. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN *HSP70H* DE LOS AISLADOS DE PMWAV-1, -2 Y -3 CARACTERIZADOS DURANTE ESTE ESTUDIO..... 88
ANEXO 7. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DEL GEN *CP* DE LOS AISLADOS DE PMWAV-1, -2 Y -3 CARACTERIZADOS DURANTE ESTE ESTUDIO..... 90
ANEXO 8. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LOS FRAGMENTOS GÉNICOS DE LA REGIÓN RT/RNASAH DE LOS RETROELEMENTOS CARACTERIZADOS DURANTE ESTE ESTUDIO..... 93
ANEXO 9. RESULTADOS DEL ANÁLISIS LOGLINEAL JERÁRQUICO..... 95
ANEXO 10. AVALES DE ACREDITACIÓN DE LA PROPUESTA A PREMIO DE LA ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA 2017. 98
ANEXO 11. ACREDITACIÓN DE LAS PUBLICACIONES, PREMIOS RAMALES DEL MINAG, PRESENTACIONES EN EVENTOS Y TALLERES..... 99

IV. COMUNICACIÓN CORTA

EL COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA: BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO

Lester Hernández Rodríguez[1*], Pedro Luis Ramos González[2▼], Victoria Zamora Rodríguez[1], Lisela Carmona[3], William Villalobos[3], Ana Arruabarrena[4], Inés Peña Bárzaga[1], Maylín Rodríguez Rubial[1], Yasmary Rubio Fontanills[5▼].

[1]Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba. [2]Instituto Biologico, Sao Paulo, Brazil. [3]Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de San José, Costa Rica. [4]Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Salto Grande, Salto, Uruguay.[5]Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas. *fitopatología@iift.cu, lesterhernandeziift@gmail.com. ▼Filiación actual.

IV.1 Introducción

La marchitez de la piña (MWP: del inglés *mealybug wilt of pineapple*), es la enfermedad de origen viral de mayor importancia para el cultivo de la piña [*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merr.]. Su etiología se ha asociado a un complejo viral compuesto por *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1*, *2*, *3*, 4 y 5 (PMWaV-1 al -5), (*Closteroviridae: Ampelovirus*) y *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) y *Pineapple bacilliform ER virus* (PBERV) (*Caulimoviridae: Badnavirus*) (Gambley y Thomas, 2015). Este complejo viral es diseminado por el material de propagación infectado y transmitido de forma semipersistente no circulativa por las cochinillas, principalmente las rosadas (*Dysmicoccus brevipe*s Cockerell) y las grises (*D. neobrevipes* Beardsley) (Sether *et al*., 1998; Gambley *et al*., 2008b).

En Cuba, investigaciones previas a este estudio demostraron la presencia de partículas closterovirales, y PMWaV-2, en plantas de piña cv. 'Cayena lisa', en Ciego de Ávila (Borroto *et al*., 1998, 2007). Sin embargo, se desconoce la presencia del complejo viral asociado a la enfermedad en el país. Asimismo, no se conoce cuál o cuáles agente(s) viral(es) están relacionados con el desarrollo de la MWP. El **objetivo general** de este trabajo fue ***Generar información, servicios y productos que permitan la implementación de medidas de manejo para la enfermedad marchitez de la piña y el complejo viral asociado a la misma***. Los **objetivos específicos** fueron: (**i**) caracterizar la enfermedad marchitez de la piña y su incidencia en plantaciones de este cultivo en Cuba, (**ii**) identificar los ampelovirus PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en los ecosistemas productivos de piña prospectados, (**iii**) caracterizar badnavirus en las áreas de piña visitadas, (**iv**) definir la relación de los agentes virales detectados con el desarrollo de síntomas de la marchitez de la piña, (**v**) evaluar un método de extracción de mezclas de los ácidos nucleicos ADN y ARN que permita la detección simultanea de ampelovirus y badnavirus y (**vi**) purificar las proteínas de cápside de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 expresadas de forma heteróloga en *Escherichia coli*.

Para determinar la presencia de la MWP en Cuba se realizaron prospecciones en 24 fincas de las provincias: Los Palacios (PR1, PR2) y Viñales, Pinar del Río (PR3), Candelaria, Artemisa (AR), Habana del Este, La Habana (LH), Los Arabos, Matanzas (MT1), Jagüey Grande, Matanzas (MT2), Corralillo, Villa Clara (VC1, VC2, VC3, VC4, VC5), La Piña, Ciego de Ávila (CA), Guáimaro (CM1) y Santa Cruz, Camagüey (CM2, CM3), Campechuela, Granma (GR), Banes, Holguín (H), San Luis, Santiago de Cuba (SC1, SC2), Niceto Pérez, Guantánamo (GN1, GN2) y la Isla de la Juventud (IJ1, IJ2, IJ3), entre junio de 2009 y diciembre de 2012.

En los cv. 'Española roja', 'Cayena lisa' y *Bromelia pinguin* L. (piña ratón), mostraron enrojecimiento y bronceado foliar (Figura 1 A, B y D). Sin embargo, en el cv. 'MD-2' solamente se observaron tonos verdes claros mezclados con moteados amarillos (Figura 1 C). En los tres cultivares y la piña ratón, se desarrolló necrosis y curvatura hacia abajo de las puntas de las hojas, flacidez y marchitez generalizada (Hernández-Rodríguez *et al*., 2013b). En las plantas de piña de jardín (*A. ananassoides* [Baker] L. B. Sm. Rank) muestreadas no se observaron los síntomas descritos anteriormente (Figura 1 E). Los síntomas coincidieron con los informados en la literatura como característicos de la marchitez de la piña (Gambley y Thomas, 2015) y se encontraron en plantas con poblaciones de cochinillas rosadas (*D. brevipes*).

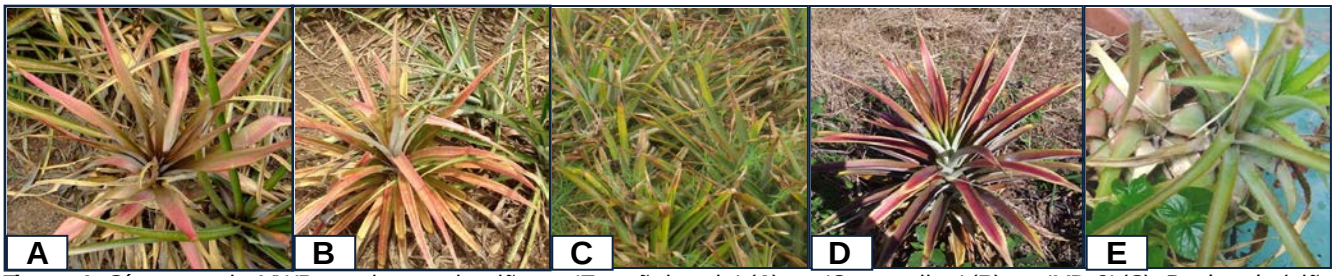


Figura 1. Síntomas de MWP en plantas de piña cv. 'Española roja' (**A**), cv. 'Cayena lisa' (**B**), cv. 'MD-2' (**C**), *B. pinguin* (piña ratón) (**D**) y *A. ananassoides* (piña enana de jardín) (**E**).

En las 24 plantaciones del cv. 'Española roja' evaluadas, se observó un total de 894 142 plantas, de las cuales el 34,6 % (332 695) presentaron todos los síntomas descritos anteriormente. La incidencia de plantas con síntomas de MWP en el 25 % de las áreas (6/24) fue alta o muy alta, [mayores al 85 %], como en La Habana, Villa Clara, Granma, Santiago de Cuba y Guantánamo. El 29 % de las plantaciones (7/24) mostró incidencia media, [6 % - 85 %], como en fincas de Pinar del Río, Artemisa, Camagüey y la Isla de la Juventud. En el restante 46 % de las plantaciones (11/24) la incidencia fue baja [inferior al 6 %], característica de algunas fincas de las provincias Pinar del Río, Matanzas, Villa Clara, Ciego de Ávila, Camagüey, Granma, Santiago de Cuba y Guantánamo.

Estos resultados evidenciaron que la MWP tiene una amplia presencia en Cuba La identificación y descripción de los síntomas asociados a una enfermedad en cada cultivar y región, constituyen una herramienta importante para la toma de medidas de manejo, específicamente para la eliminación oportuna de fuentes primarias de inóculo (Islam, 2017). La amplia presencia de los síntomas de MWP en las áreas comerciales pudiera explicarse por el uso exclusivo de la propagación vegetativa, factor que ha favorecido una amplia diseminación y diversidad de agentes virales en el cultivo. Para afirmar esta hipótesis, se colectaron un total de 144 muestras en todas las áreas prospectadas, tanto de plantas sintomáticas como asintomáticas, aspectos que se abordarán a continuación.

La presencia de los ampelovirus PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en Cuba se realizó mediante la extracción de los ARN totales con el método del reactivo TRIZOl (Invitrogen, Carlbad, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y RT-PCR para la amplificación de un fragmento del gen *hsp70h* (amplicón HSP70h), con los pares de cebadores 225/226 [PMWaV-1], 223/224 [PMWaV-2] y 263/264 [PMWaV-3] según Sether *et al*. (2005a). La caracterización de los aislados se efectuó mediante la secuenciación del amplicón HSP70h, y el gen *cp* de estas especies (amplicón CP), amplificado con los

cebadores CP227/CP228 [PMWaV-1], CP229/CP230 [PMWaV-2] y CP231/CP232 [PMWaV-3] (Hernández-Rodríguez *et al*., 2014).

En la RT-PCR-HSP70h (amplicón HSP70h) de las plantas seleccionadas, se amplificaron bandas con una talla superior a los 500 pb con el uso de los cebadores 225/226 (Figura 2 A, carriles 1, 2 y 4). De forma análoga, a partir de estos extractos, pero con los cebadores 223/224 (detección de PMWaV-2), se evidenció la amplificación de bandas con una talla superior a los 600 pb (Figura 2 B, carriles 1 y 4), y aproximada a los 500 pb con el par 263/264 (detección de PMWaV-3) (Figura 2 C, carriles 1, 3 y 4). Estas tallas coincidieron con las esperadas de 590 pb (PMWaV-1), 610 pb (PMWaV-2) y 490 pb (PMWaV-3), para la amplificación de fragmentos del gen *hsp70h* con el uso de los cebadores (Sether *et al*., 2005b).

El procesamiento de muestras de un conjunto de plantas seleccionadas de algunas de las fincas prospectadas mostró la amplificación de las bandas esperadas en varias de las plantas analizadas (Tabla 1).

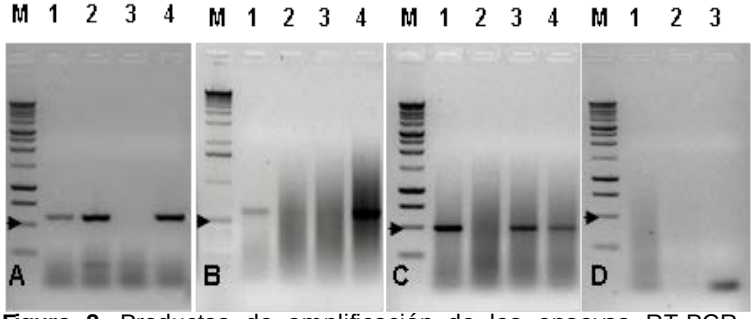


Figura 2. Productos de amplificación de los ensayos RT-PCR-HSP70h para la detección de PMWaV-1 (**A**: cebadores 225/226), PMWaV-2 (**B**: 223/224) y PMWaV-3 (**C**: 263/264), a partir de extractos de plantas de piña cv. 'MD-2' de Ciego de Ávila. Carriles **1-4**: plantas CA MD2-2, CA MD2-5, CA MD2-7 y CA MD2-4. **M**: escalera de 1 kb (Promega) (**A**, **C** y **D**) y de 100 pb (Promega) (**B**) [las flechas indican la banda de 500 pb]. **D**: Controles negativos (extracto de planta cv. 'MD-2' obtenida por cultivo *in vitro* de meristemos), de cada ensayo (Carriles **1-3**, PMWaV-1 al -3).

Las secuencias de los amplicones HSP70h (PMWaV-1: 590 nt, PMWaV-2: 610 nt y PMWaV-3: 490 nt) y CP (PMWaV-1: 773 nt, PMWaV-2: 900 nt y PMWaV-3: 789 nt), se depositaron en el GenBank y los porcentajes de identidad nucleotídica y aminoacídica de los amplicones HSP70h y CP de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 caracterizados en este estudio, con respecto a las secuencias de los aislados de las mismas especies de PMWaV, fueron superiores al 86,9 %.

Tabla 1. Diagnóstico mediante RT-PCR-HSP70h de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en las plantas seleccionadas. IJ1: Isla de la Juventud, finca 1; PR2: Pinar del Río, Los Palacios, finca 2; LH: La Habana, Habana del Este; CA: Ciego de Ávila, La Piña; HG: Holguín, Banes; ER: 'Española roja', BP: *B. pinguin*, AA: *A. ananassoides,* MD2: 'MD-2'.

Planta	Infección PMWaV[a]			Planta	Infección PMWaV[a]		
	1	2	3		1	2	3
IJ1 ER-1	-	+	-	CA MD2-2	+	+	+
IJ1 ER-2	-	+	+	CA MD2-5	+	-	-
IJ1 ER-3	-	-	+	CA MD2-4	+	+	+
IJ1 ER-4	-	+	+	CA MD2-7	-	-	+
PR2 BP-1	-	+	-	CA BP-1	-	+	-
PR2 BP-2	-	+	-	CA BP-2	-	+	-
PR2 BP-3	-	+	-	CA BP-3	-	+	-
PR2 BP-4	-	+	-	CA BP-4	-	+	-
LH ER-1	+	+	+	CA AA-1	-	-	-
LH ER-2	+	-	-	CA AA-2	-	-	-
LH ER-3	-	+	-	HG BP-1	-	+	-
LH ER-4	-	+	-	HG BP-2	-	+	-
LH ER-5	-	+	+	HG BP-3	-	+	-
LH AA-1	-	-	-	HG BP-4	-	+	-
LH AA-2	-	-	-				

[a] + y -: resultado positivo y negativo en el diagnóstico mediante la RT-PCR-HSP70h.

Según el criterio de demarcación en la familia Closteroviridae, valores superiores al 75 % de identidad nucleotídica en la comparación de los ORFs de la HSP70h, la CP o la RdRp, los valores de identidades nucleotídicas obtenidos indicaron definitivamente la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en las plantas diagnosticadas (Martelli et al., 2012a).

Estos resultados permitieron realizar los primeros informes de PMWaV-1 y PMWaV-3 en plantaciones comerciales de piña en Cuba y en la Cuenca del Caribe, así como la presencia de PMWaV-2 en otras áreas del país alejadas de Ciego de Ávila (Isla de la Juventud y La Habana), y en otros cultivares de piña ('Española roja' y 'MD-2'). Con anterioridad a esta investigación, sólo se había informado en Cuba la presencia de partículas virales similares a la de los closterovirus, y posteriormente la presencia de PMWaV-2 en tres plantas de piña cv. 'Cayena lisa' de la estación experimental "Tomás Roig", Ciego de Ávila (Borroto et al., 1998, 2007). Asimismo, se demostró que PMWaV-2 infecta a la piña ratón (*Bromelia pinguin*), primer informe de esta planta como su hospedante natural (Hernández-Rodríguez *et al*., 2010a, 2010b, 2013b, 2014).

La caracterización de badnavirus en las áreas de piña visitadas se realizó mediante la extracción del ADN total con el método de CTAB de Murray y Thompson (1980) y la detección por la PCR-Badnavirus con los cebadores degenerados Badna-1A y Badna 4 (Geering *et al*., 2005a). El procesamiento por la PCR-Badnavirus de 12 muestras colectadas en Granma (GR ER-1 a -4); La Habana (LH ER-3 y -4); Guantánamo (GN1 ER-1 a -2) y Matanzas (MT1 ER-2 y -3), mostró la amplificación de una banda con una talla aproximada de 600 pb en ocho de ellas (amplicón RT/RNasaH) (Figura 3 B, carriles 1-5). La talla de los amplicones obtenidos coincidió con la esperada según los cebadores Badna-1a/Badna 4, los que amplifican un fragmento de entre 546 pb-572 pb de la región RT/RNasaH de los caulimovirus (Geering *et al*., 2005a). En la reacción utilizando el blanco experimental (H_2Odd), no se obtuvo banda alguna (Figura 3 B, carril 6).

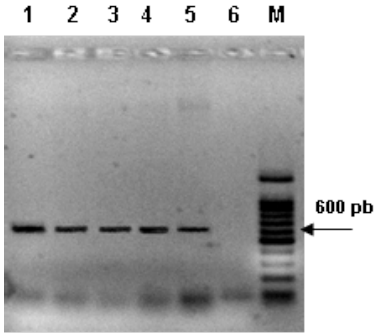


Figura 3. Productos amplificados en la PCR-Badnavirus a partir de de plantas de piña cv. 'Española roja' colectadas en: **1**-Granma (GR ER-1); **2**-La Habana (LH ER-4); **3**-Guantánamo (GN1 ER-2), **4**-Matanzas (MT1 ER-2), **5**-extracto de piña obtenida a partir de cultivo *in vitro* de meristemos (CA MD2-15) y **6**-H_2Odd. **M**- Escalera 100 pb (Promega).

Al comparar las secuencias obtenidas del primer grupo (GR ER-1, LH ER-4, GN1 ER-2 y MT1 ER-2), con las depositadas en las bases de datos internacionales, se encontraron porcentajes superiores al 80,1 % (identidad nucleotídica) y 93,3 % (identidad aminoacídica) con aislados de *Pineapple baciliform CO virus*, PBCOV, de Hawái. La secuencia de BCA MD2-15 mostró porcentajes de identidad nucleotídica y aminoacídica entre el 91,7 % y 95,6 % con las de endogenous Pineapple pararetrovirus-1 (ePPRV-1) de Australia y endogenous Pineapple baciliform CO virus ePBCOV-HI1 de Hawái. De acuerdo con el criterio de demarcación de especies dentro de la familia *Caulimoviridae* (80 % de identidad nucleotídica, Geering y Hull, 2012), los amplicones RT/RNasaH BGR ER-1, BLH ER-4, BGN1 ER-2 y BMT1 ER-2 se correspondieron con aislados de PBCOV de Cuba y el amplicón BCA MD2-15 se identificó como un aislado cubano de ePBCOV.

Estos resultados constituyeron los primeros informes de PBCOV y ePBCOV en América (Hernández-Rodríguez *et al*., 2013a, 2014). Los amplicones de RT/RNasaH obtenidos a partir de los cuatro aislados de PBCOV caracterizados durante este estudio permitieron obtener una

sonda (RT/RNasaH-PBCOV) con la que se desarrolló un ensayo de dot blot no radioactivo para el diagnóstico de PBCOV (Dot Blot-PBCOV).

Para definir la relación de los agentes virales detectados con el desarrollo de síntomas de la marchitez de la piña y la presencia de los virus detectados previamente en las tres regiones geográficas de Cuba, las 144 muestras colectadas durante las prospecciones se analizaron mediante la RT-PCR-HSP70h (ARN) para la detección de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3, y el Dot Blot-PBCOV (ADN), para PBCOV (Hernández-Rodríguez *et al*., 2014). El diagnóstico mostró la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV en las tres regiones geográficas de Cuba. PMWaV-2 y PBCOV se detectaron en todas las plantaciones de las provincias muestreadas. Sin embargo, PMWaV-1 no se detectó en las fincas de la Isla de la Juventud y Camagüey, y PMWaV-3 no se encontró en las fincas VC2 de Villa Clara y CM3 de Camagüey.

La asociación estadística de la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV con los síntomas de la enfermedad MWP se realizó según Gambley *et al*. (2008a). El análisis del conjunto de 144 muestras analizadas por las tres metodologías de RT-PCR y el Dot Blot-PBCOV mediante el modelo estadístico loglineal, mostró relación entre las dos variables, presencia de alguno de los cuatro virus y sus combinaciones en las infecciones mixtas, con el estado sanitario de la planta, con significación $p<0,01$.

De las 144 plantas analizadas, el 14,6 % (21/144) contuvo una infección simple por PMWaV-2 y todas fueron plantas sintomáticas. El análisis estadístico mostró una asociación significativa entre la presencia de esta especie viral y los síntomas de MWP ($p<0,01$). Las combinaciones virales que se asociaron con la presencia de síntomas en las plantas ($Z<0$) fueron aquellas en las que siempre se encontró PMWaV-2. Los métodos de detección desarrollados para PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV fueron utilies para el diagnóstico específico de estos agentes virales. Los resultados evidenciaron la necesidad de la implementación de una estrategia de manejo de la enfermedad que incluye un Sistema para la Producción de Material de Propagación Certificado de Piña.

Con el objetivo de disminuir los costos de los métodos de diagnóstico desarrollados para que sean factibles para su uso en este sistema, se evaluaron varias alternativas. Primeramente, se evaluó un método de extracción de mezclas de los ácidos nucleicos ADN y ARN para la detección de ampelovirus y badnavirus, que fuera menos costoso y con una menor manipulación. El protocolo de extracción de mezcla de ADN y ARN se evaluó a partir del procesamiento de tejidos de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.) y tres especies de cítricos: naranjo dulce 'Pineapple' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), limero 'Mejicano' (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.*)* y cidro 'Etrog' *(C. medica* L.*).* Los resultados mostraron que el método produce una mezcla de extractos de ADN y ARN similar a los dos métodos utilizados en la comparación (Figura 4, comparar método 1 *vs*. 2 y 3).

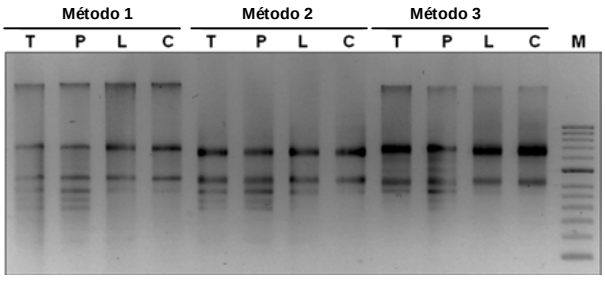


Figura 4. Productos de ácidos nucleicos obtenidos con los tres métodos evaluados (1: pH bajo; 2: TRIzol (Ambion, Life technologies) y 3: columnas spin (RNeasy plant mini kit, QIAGEN) utilizando tejidos de tomate (T), papa (P), limero Mejicano (L) y cidro Etrog (C). M: Marcador de peso escalera HyperLadder™ 50bp (Bioline).

Los ARN extraídos se utilizaron en ensayos de RT-PCR para la detección de begomovirus,

crinivirus, potyvirus, closterovirus, ophiovirus y varios viroides (Arruabarrena *et al*., 2016), así como para el diagnóstico en las mismas muestras de los ampelovirus PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 mediante la RT-PCR-HSP70h y el badnavirus PBCOV por el Dot Blot-PBCOV.

Con el objetivo de aislar y purificar las proteínas de cápside de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 expresadas de forma heteróloga en *Escherichia coli,* los genes *cp* de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 clonados anteriormente, se sub-clonaron en el plasmidio comercial pQE-30 (Qiagen). Los análisis de los productos de expresión de las cepas transformadas mostraron en la SDS-PAGE bandas de proteínas diferenciales en los cultivos transformados con las tres construcciones para la expresión de de la CP de PMWaV-1, -2 y -3, entre ellos y respecto al control negativo (Figura 5, carriles 2, 3 y 4 entre sí, y contra carril 1, bandas marcadas).

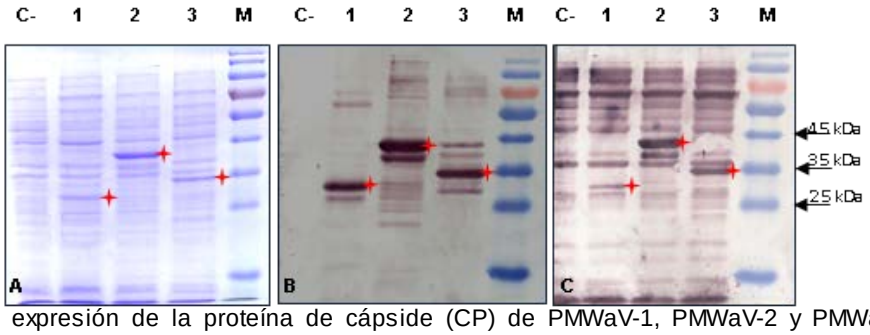


Figura 5. Análisis de expresión de la proteína de cápside (CP) de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en extractos de proteínas totales de cultivos de *Escherichia coli* cepa M-15, transformada con las construcciones genéticas: plásmidio pQE-30 (QIAGEN) con el gen *cp* de cada PMWaV clonado. A: SDS-PAGE de los extractos de proteínas totales. B y C: Western Blot con anti-His (Qiagen) y mezcla de policlonales anti-CP PMWaV-1, -2 y -3, respectivamente. Carriles: 1- cepa transformada con el plásmidio pQE-30 (control negativo), 2, 3 y 4- cepa transformada con clones pQE-30 + gen cp de PMWaV-1, -2 y -3, respectivamente, M: marcador Page Ruler Prestained proteína Ladder (Fermentas).

Las bandas diferenciales mostraron un peso molecular entre los 25 kDa y 35 kDa para la expresión de la CP de PMWaV-1 y -3, y entre los 35 y 45 kDa para la CP de PMWaV-2. El peso molecular de estas bandas coincidió con el predicho de la CP de PMWaV-1, -2 y -3, que fue de 28,1 kDa, 34 kDa y 28,8 kDa, respectivamente (Melzer *et al*., 2001; 2008; Sether *et al*., 2009). Estas bandas reaccionaron con el anticuerpo policlonal obtenido en ratón *Mouse anti-RGS (His)$_4$* (Qiagen) (Figura 5, B), específico para el aminoácido histidina, y una mezcla de anticuerpos anti-CP PMWaV-1, -2 y -3 (GenScript) (Figura 5, C). Las bandas con los pesos correspondientes a la CP de PMWaV-1, -2 y -3 se purificaron de forma parcial pero con suficiente cantidad para ensayos de inmunización.

En Cuba, la tecnología del cultivo de la piña recomienda la aplicación de acciones para el control de la enfemedad MWP y sus vectores potenciales (Colectivo de autores, 2011). Estas acciones incluyen el control químico de las cochinillas y las hormigas, las eliminación de los restos de la plantación anterior para evitar fuentes de infección, la eliminación de plantas con síntomas de enfermedades virales y el uso de un correcto programa de fertilizaciones que garantice un buen estado nutricional de las plantas (Colectivo de autores, 2011). Sin embargo, la presencia del complejo viral asociado a la MWP en infecciones simples o mixtas, plantas con síntomas de la enfermedad con incidencias de hasta el 100 % en algunas áreas, y del vector potencial cochinilla rosada (*D. brevipes*), en todas las fincas prospectadas, indican la necesidad de la implementación de un programa de manejo que garantice el control de la MWP en el país. Este hecho, tomando en cuenta (i) la multiplicación vegetativa que se emplea

para propagar la piña, (ii) las escasas atenciones culturales y (iii) el poco uso de control químico de los insectos vectores, indican el alto riesgo que representa la MWP.

IV.2 Referencias bibliográficas

- Arruabarrena, A., Benítez-Galeano, M. J., Giambiasi, M., Bertalmío, A., Colina, R., Hernández-Rodríguez, L, "Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection". Journal of Virological Methods 237: 14–17, 2016.
- Colectivo de autores, "Instructivo técnico para el cultivo de la piña". Edts: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ed. Biblioteca ACTAF. ISBN: 978-959-7210-42-9. Págs: 26, 2011.
- Gambley, C. y Thomas, J., "Mealybug Wilt Disease En: Virus Diseases of Tropical and Subtropical Crops". Editores: Tennant P. y Fermin G. Editorial CABI. Págs: 228–236, 2015.
- Hernández, L., Ramos, P. L., Rodríguez, M., Zamora, V., Peña, I., y Pérez, J. M., "Detección de ampelovirus asociados a la enfermedad de la marchitez de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en la Isla de la Juventud, Cuba". CitriFrut 27(1): 39–46, 2010a.
- Hernández, L., Ramos, P.L., Rodríguez, M., Peña, I., Pérez, J. M., "First report of *Pineapple mealybug wilt associated virus*-3 infecting pineapple in Cuba". New Disease Reports 22: 18, 2010b.
- Hernández-Rodríguez, L. y Ramos-González, P. L., Garcia-Garcia, G., Higginson, E. J., Zamora-Rodriguez, V., "First report of *Pineapple bacilliform comosus virus* (PBCoV) and endogenous Pineapple pararetrovirus-1 (ePPRV-1) in pineapple plants in Cuba". New Disease Reports 28: 2, 2013a.
- Hernández-Rodríguez, L. y Ramos-González, P. L., Garcia-Garcia, G., Zamora, V., Peña, I., Pérez, J. M., Ferriol, X., "Diseminación de la enfermedad marchitez de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en plantaciones comerciales de Cuba. CitriFrut 30(2): 43–54, 2013b.
- Hernández-Rodríguez, L. y Ramos-González, P. L., Garcia-Garcia, G., Zamora, V., Peralta-Martin, A.M., Peña, I., Perez, J. M., Ferriol, X., "Geographic distribution of mealybug wilt disease of pineapple and genetic diversity of viruses infecting pineapple in Cuba". Crop Protection 65: 43–50, 2014.
- Islam, W., "Management of plant virus diseases; farmer's knowledge and our suggestions". Hosts and Viruses. 4(2): 28–33, 2017.
- Melzer, M.J., Karasev, A.V., Sether, D.M., Hu, J.S., "Nucleotide sequence, genome organization, and phylogenetic analysis of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-2". J. Gen. Virol. 82, 1–7, 2001.
- Melzer, M.J., Sether, D.M., Karasev, A.V., Hu, J.S., "Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1". Arch. Virol. 153, 707–714, 2008.
- Sether, D.M., Melzer, M.J., Borth, W.B., Hu, J.S., "Genome organization and phylogenetic relationship of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 and other family *Closteroviridae* members". Virus Genes 38, 414–420, 2009.

V. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICO-TÉCNICA DE LOS RESULTADOS

EL COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA: BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO

Lester Hernández Rodríguez[1*], Pedro Luis Ramos González[2▼], Victoria Zamora Rodríguez[1], Lisela Carmona[3], William Villalobos[3], Ana Arruabarrena[4], Inés Peña Bárzaga[1], Maylín Rodríguez Rubial[1], Yasmary Rubio Fontanills[5▼].

[1]Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba. [2]Instituto Biológico, Sao Paulo, Brasil. [3]Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, Universidad de San José, Costa Rica. [4]Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Salto Grande, Salto, Uruguay.[5]Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas. *fitopatología@iift.cu, lesterhernandeziift@gmail.com. ▼Filiación actual.

V.1 Introducción

La piña [*Ananas comosus* var*. comosus* (L.) Merril] (*Bromeliaceae*) es uno de los frutales de más amplia comercialización en el mundo (Paull y Duarte, 2011), con una producción mundial de 25,4 millones t, en un área total plantada de 1,02 millones de hectáreas en el año 2014 (FAO, 2014). Particularmente en Cuba, es un cultivo priorizado como parte de los programas nacionales de desarrollo y diversificación de frutales (Llauger *et al*., 2009), y en el 2016 se alcanzó una producción anual de 39 981,9 t, en 2 070,2 ha (Colectivo de autores, 2016).

La marchitez de la piña (MWP: del inglés *mealybug wilt of pineapple*), es la enfermedad de origen viral de mayor importancia en este cultivo, diseminada en la mayoría de las áreas productoras del mundo (Gambley y Thomas, 2015). Los síntomas característicos son, enrojecimiento y bronceado de las hojas, pérdida de turgencia y muerte regresiva foliar, y reducción de la masa radicular, que en su conjunto pueden ocasionar la muerte de la planta (Sether y Hu, 2002a). Además, ocurren cambios en los ciclos de fructificación del vegetal, disminuye el calibre de los frutos, y aumenta su acidez y consistencia fibrosa, hasta perder el valor comercial (Nieves et al., 1996; Sether y Hu, 2001a, 2002b).

Su etiología aún no está dilucidada, por lo que se ha asociado un complejo de cinco ampelovirus (*Closteroviridae*): *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1*, *2*, *3*, 4 y 5 (PMWaV-1 al -5), y dos badnavirus (*Caulimoviridae*): *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) y *Pineapple bacilliform ER virus* (PBERV) (Gambley y Thomas, 2015). La diseminación de estos virus ocurre por la multiplicación de material vegetativo infectado, forma tradicional de propagación de la piña (Sether *et al*., 2010). Las cochinillas, principalmente las rosadas (*Dysmicoccus brevipes* Cockerell) y las grises (*D. neobrevipes* Beardsley), transmiten los ampelovirus y badnavirus, de forma semipersistente no circulativa (Sether *et al*., 1998; Subere *et al*., 2011; Gambley *et al*., 2008b).

Existen elementos contradictorios en cuanto a cuál o cuáles de los virus del complejo viral se asocian directamente con la MWP. En Hawái, la enfermedad sólo se desarrolla en plantas infectadas por PMWaV-2 que contengan cochinillas (Sether y Hu*,* 2002a). En cambio, en Australia, se encontró una alta correlación entre la MWP y la presencia de PMWaV-1, PMWaV-3, o su infección mixta, pero no con PMWaV-2 (Gambley *et al.,* 2008a). PMWaV-4 y PMWaV-5 sólo se detectaron de forma muy ocasional y limitada, y no se asociaron síntomas a su infección en las plantas de piña analizadas (Gambley y Thomas, 2015).

El desarrollo del cultivo de la piña en Cuba transitó por períodos de estimulación y depresiones, que se asoció, a la falta de suministros agrícolas, malas prácticas culturales y a la presencia de plagas (Isidrón *et al*., 2003). Investigaciones previas a este trabajo relacionadas con esta enfermedad demostraron la presencia de partículas closterovirales, y de PMWaV-2, en tres plantas de piña cv. 'Cayena lisa', de la Estación Experimental "Tomás Roig", Ciego de Ávila (Borroto *et al*., 1998, 2007). Sin embargo, se desconoce la presencia del complejo viral asociado a la enfermedad marchitez de la piña en las plantaciones comerciales de Cuba. Asimismo, no se conoce cuál o cuáles agente(s) viral(es) están relacionados con el desarrollo de la MWP en el país. Tampoco se cuenta con bioproductos que permitan el biocontrol de hongos en pre o poscosecha.

El **objetivo general** de este trabajo fue ***Generar información, servicios y productos que permitan la implementación de medidas de manejo para la enfermedad marchitez de la piña y el complejo viral asociado a la misma***. Para cumplimentar el objetivo general se trazaron los siguientes **objetivos específicos**: (**i**) caracterizar la enfermedad marchitez de la piña y su incidencia en plantaciones de este cultivo en Cuba, (**ii**) identificar los ampelovirus PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en los ecosistemas productivos de piña prospectados, (**iii**) caracterizar badnavirus en las áreas de piña visitadas, (**iv**) definir la relación de los agentes virales detectados con el desarrollo de síntomas de la marchitez de la piña, (**v**) evaluar un método de extracción de mezclas de los ácidos nucleicos ADN y ARN que permita la detección simultanea de ampelovirus y badnavirus, y (**vi**) purificar las proteínas de cápside de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 expresadas de forma heteróloga en *Escherichia coli*.

V.2 Resultados y Discusión

V.2.1 Caracterización de la enfermedad marchitez de la piña y su incidencia en plantaciones de este cultivo en Cuba

Para determinar la presencia y caracterizar los síntomas de MWP en plantaciones de cultivares comerciales de piña de Cuba, o en bromeliáceas no comerciales que pudieran ser posibles hospedantes alternativos, los insectos vectores asociados, y colectar muestras para identificar el complejo viral asociado, se realizaron prospecciones en 24 fincas de diez provincias, y la Isla de la Juventud, entre junio de 2009 y diciembre de 2012 (Tabla 2). Las fincas inspeccionadas se nombraron con las iniciales de la provincia, o municipio, en el caso de la Isla de la Juventud (ej.: LH, finca prospectada en Habana del Este, La Habana). Cuando se prospectó más de una finca en una misma localidad, se añadió un número al código anterior (ej.: IJ1, se refiere a la finca #1, de las tres prospectadas en la Isla de la Juventud) (Tabla 2).

La incidencia de plantas con síntomas de MWP se calculó como la razón de plantas sintomáticas/total plantas inspeccionadas multiplicada por 100. El total de plantas se estimó por la densidad (plantas/ha) según el marco de cada plantación, sólo se realizó en las áreas del cv. 'Española roja' (Tabla 2). En plantaciones con áreas menores a 2 ha se inspeccionó el 100 % de las plantas, mientras que en plantaciones mayores de 2 ha se inspeccionó el 10 % de cada bloque de 1 ha, siguiendo el método de muestreo sistemático con un patrón en forma de "W" (Gottwald, 1995; Sether *et al*., 2010). En plantaciones con áreas superiores a las 2 ha, la incidencia se estimó mediante la división de la cantidad de plantas sintomáticas determinadas en el 10 % del total de plantas del área, dividido entre el 10 % del total de plantas, todo multiplicado por 100.

Tabla 2. Total de plantas de diferentes cultivares y especies de bromeliáceas prospectadas en las diferentes regiones y provincias del país en el período del 2009 - 2012.

Región	Finca	Localidad	Coordenadas		Fecha	Área (ha)	Cultivares y especies[a]	Plantas prospectadas[b]	# muestras colectadas[c]	
			X	Y					S	AS
OCCIDENTAL	IJ1	Isla de la Juventud	-82,88	21,89	06/2009	1	'Española roja'	27777	3	1
	IJ2		-82,81	21,84	06/2009	0,5		13888	3	1
	IJ3		-82,73	21,82	06/2009	0,7		19444	3	3
	PR1	Los Palacios, Pinar del Río	-83,30	22,59	10/2011	3	'Española roja'	83331	4	0
	PR2		-83,20	22,58	10/2011	2	'Española roja'	55554	4	3
						-	*Bromelia pinguin*	-	4	0
	PR3	Viñales, Pinar del Río	-83,75	22,65	10/2012	1,5	'Española roja'	41665	5	1
	AR	Candelaria, Artemisa	-83,01	22,80	10/2011	1	'Española roja'	27777	3	3
	LH	Habana del Este, La Habana	-82,14	23,13	01/2010	2	'Española roja'	55554	4	1
	LH				01/2010	-	*A. ananassoides*	-	0	2
	MT1	Los Arabos, Matanzas	-80,69	22,69	01/2010	14	'Española roja'	38888	4	0
	MT2	Jagüey Grande, Matanzas	-81,2o	22,64	01/2010	1,5	'Española roja'	41665	4	0
CENTRAL	VC1	Corralillo, Villa Clara	-80,64	23,95	06/2010	10	'Española roja'	27499	3	3
	VC2		-80,57	22,94		15		41666	3	1
	VC3		-80,52	22,91		20		55554	3	1
	VC4		-80,46	22,88		7		19444	2	2
	VC5		-80,40	22,86		25		69443	3	1
	CA	La Piña, Ciego de Ávila	-78,77	21,84	10/2012	2	'Española roja'	55554	2	5
					10/2010	-	'MD-2'	-	4	0
					10/2012	-	'MD-2'	-	2	0
					12/2012	-	'MD-2'	-	0	28
						-	*A. ananassoides*	-	0	2
						-	*Bromelia pinguin*	-	4	0
	CM1	Guáimaro, Camagüey	-77,38	21,23	02/2010	3	'Española roja'	8333	3	1
	CM2	Santa Cruz, Camagüey	-78,06	20,92	02/2010	3		8333	4	0
	CM3		-77,99	20,81		5		13889	2	0
ORIENTAL	GR	Campechuela, Granma	-77,19	20,17	08/2010	8	'Española roja'	22222	3	1
						-	'Cayena lisa'	-	-	-
	HG	Banes, Holguín	-75,75	20,96	08/2010	-	*Bromelia pinguin*	-	4	0
	SC1	San Luis, Santiago de Cuba	-75,77	20,37	08/2010	1	'Española roja'	27777	2	2
	SC2		-75,81	20,30	08/2012	1	'Española roja'	27777	5	1
	GN1	Niceto Pérez, Guantánamo	-75,39	20,14	02/2010	2	'Española roja'	55554	3	1
	GN2		-75,36	20,08	02/2010	2	'Española roja'	55554	4	0
	24	**10**			**2009-12**			**894 142**	**85**	**59**

[a] Los cultivares 'Española roja', 'Cayena lisa', 'MD-2', y las especies *A. ananassoides* y *Bromelia pinguin*, se inspeccionaron para la identificación de síntomas. Solamente en las áreas del cv. 'Española roja' se determinó la incidencia. Se colectaron muestras para el diagnóstico de virus en los cv. 'Española roja' y 'MD-2', y las especies *A. ananassoides*, *Bromelia pinguin.*
[b] En plantaciones con áreas mayores a 2 ha se prospectó solamente el 10 % de las plantas, y el valor que aparece en la tabla se corresponde con la cantidad real de plantas inspeccionadas.
[c] S: plantas con síntomas y AS: plantas asintomáticas.

En cada finca prospectada se colectaron de cuatro a seis muestras al azar para determinar la presencia de los agentes del complejo viral asociado a la MWP (Tabla 2). Las muestras se colectaron en plantas con síntomas y que estuvieran infestadas por cochinillas, así como de aquellas que no mostraron síntoma alguno. Las muestras se envolvieron en papeles húmedos

y se trasladaron en bolsas de nailón hacia el laboratorio de Virología Vegetal del IIFT, La Habana, Cuba. Inmediatamente, se extrajeron las fracciones de ARN y ADN para el diagnóstico de los virus, según los procedimientos que se describen a continuación. Se formó un banco con los extractos de ARN y ADN de cada muestra colectada, que se conservaron hasta para su posterior diagnóstico.

En las 24 plantaciones comerciales de piña prospectadas, en las que predominó el cv. 'Española roja', se encontraron plantas con enrojecimiento (Figura 6 A) y bronceado foliar (Figura 6 B). Además se observó la necrosis del ápice o la muerte regresiva de la hoja (en forma de ¨V¨ invertida), y la curvatura hacia abajo de la punta (Figura 6 C y D, respectivamente). Estos síntomas contrastaron con el color verde, sin necrosis ni hojas curvadas de las plantas asintomáticas (Figura 6 E). Los síntomas coincidieron con los informados en la literatura como característicos de la enfermedad marchitez de la piña (Gambley y Thomas, 2015).

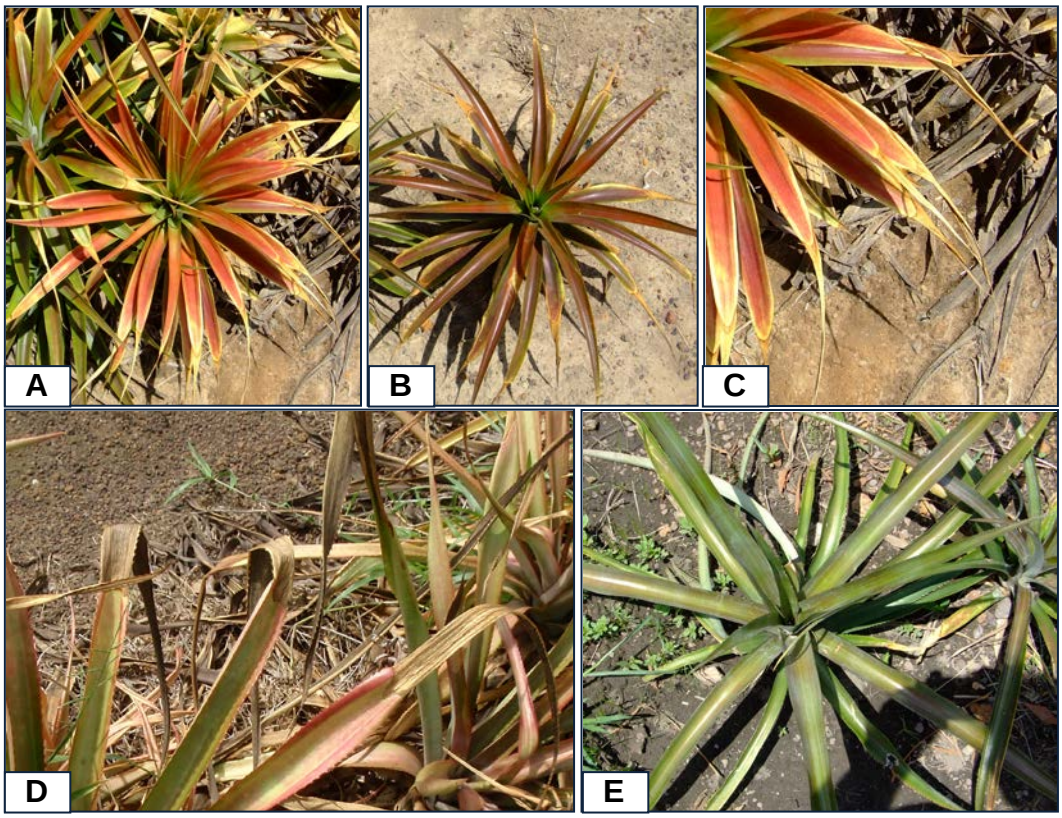


Figura 6. Síntomas de MWP en plantas de piña cv. 'Española roja' del municipio Isla de la Juventud, Cuba, junio 2009. **A**: Plantas con enrojecimiento foliar; **B**: Planta con bronceado foliar; **C**: muerte regresiva de las hojas en forma de ¨V¨ invertida; **D**: curvatura de los ápices de las hojas hacia abajo y **E**: planta asintomática.

En el cv. 'Cayena lisa', los síntomas fueron similares a los observados en las plantas del cv. 'Española roja', y se caracterizaron por el enrojecimiento, aunque en ocasiones se apreció una coloración tendiente al naranja (Figura 7 A y B). Sin embargo, en el cv. 'MD-2' solamente se observaron tonos verdes claros mezclados con moteados amarillos (Figura 7 C), aspecto que diferenció los patrones observados en los cvs. 'Española roja' y 'Cayena lisa'. En los tres cultivares se desarrolló necrosis y curvatura hacia abajo de las puntas de las hojas, flacidez y marchitez generalizada.

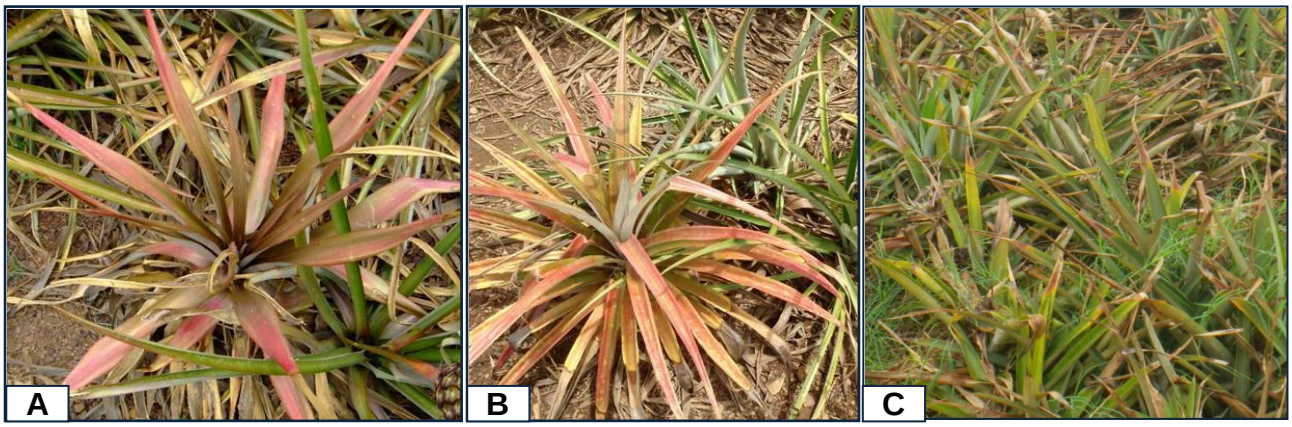


Figura 7. Síntomas de la enfermedad de la "marchitez de la piña" en los cultivares: 'Española roja' (**A**), 'Cayena lisa' (**B**) y C: 'MD-2' (**C**).

En las plantaciones comerciales del cv. 'Española roja' con alta incidencia de MWP (mayores que 25 %) se observaron patrones visuales de agregados de plantas rojas, rodeadas de las verdes asintomáticas (Figura 8 A y B). Este es el caso de las plantaciones de las fincas VC1 y VC5 (Tabla 2, Corralillo, Villa Clara), con 90,2 % y 99 % de incidencia de plantas sintomáticas.

La presencia de los grupos rojizos contrastó con la apariencia asintomática de las plantas de alrededor (Figura 8 A y B). En la finca VC5, debido a la elevada incidencia de MWP, el patrón fue menos visible que en la VC1. Esta característica se diferenció de la finca MT2 (Tabla 2) de Jagüey Grande, Matanzas (Figura 8 C), en la que no fue posible observar el patrón debido a

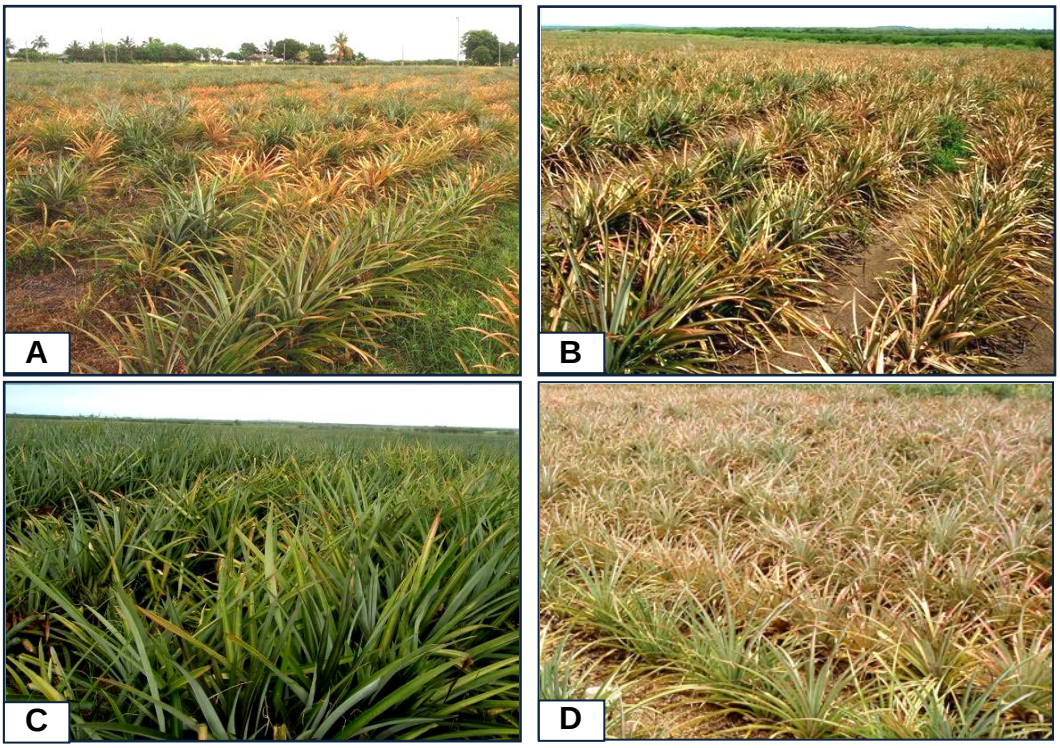


Figura 8. Patrones de plantas con síntomas de MWP en plantaciones de piña con diferentes incidencias. **A**: Finca VC1, 10 ha y **B**: Finca VC5, 25 ha, ambas en Villa Clara, del cv. 'Española roja' con incidencia de plantas con síntomas de MWP de 90 % y 99 %, respectivamente; **C**: finca MT2 del cv. 'Española roja' de Jagüey Grande, Matanzas, con 0,01 % de plantas MWP y **D**: finca GR de Campechuela, Granma, bloque de 'Cayena lisa' con incidencia indeterminada (bloque completo rojizo).

la baja incidencia de plantas sintomáticas (0,01 %).

Por otro lado, en un bloque plantado con el cv. 'Cayena lisa', en la finca GR (Tabla 2), Campechuela, Granma, se observó un patrón visual de agregación de las plantas enrojecidas (Figura 8 D). Sin embargo, en este caso el patrón fue homogéneo, y se diferenció de los descritos anteriormente (comparar Figura 8 A y B *vs*. D). En esta finca, durante las prospecciones se encontró un fuerte estrés debido a la falta de riego y precipitaciones en la zona, lo que ocasionó el patrón homogéneo de plantas con color rojizo.

En la prospección de síntomas de MWP en otras bromeliáceas para la identificación de hospedantes alternativos se observaron en Banes, Holguín, en junio del 2009, se observaron plantas de piña ratón (*Bromelia pinguin* L.) con síntomas de enrojecimiento foliar, necrosis y curvatura hacia abajo de la punta de las hojas (Figura 9). Así mismo, en Ciego de Ávila y en el municipio Los Palacios, Pinar del Río, se observaron cercas compuestas por plantas de esta especie que también mostraron estos síntomas. Excepto en Banes, todas las demás cercas de piña ratón inspeccionadas y muestreadas, colindaron con plantaciones de piña adultas (*A. comosus* cv. 'Española roja') (Tabla 2).

En la mayoría de las plantas de piña ratón se observó enrojecimiento y marchitez (Figura 9 A), apariencia que se diferenció de otras cercas en las que las plantas conservaban el color verde y desarrollo exuberante, característicos de esta especie (Figura 9 D). De la misma forma que en los cv. 'Española roja' y 'Cayena lisa', además del color rojo y la marchitez, se observó la necrosis y torcedura hacia abajo de la punta de las hojas (Figura 9 B y C). En los tres lugares prospectados se colectaron cuatro muestras para el análisis de la presencia de infecciones virales.

Se colectaron dos plantas de piña de jardín o piña piña enana (*A. ananassoides* [Baker] L. B. Sm. Rank) de una casa particular del municipio Playa, La Habana, en febrero de 2010. Estas plantas mostraron un color rojizo, aunque con menor intensidad que en los otros cultivares de piña y la especie piña ratón. En Ciego de Ávila, se muestrearon dos plantas de esta misma especie que tampoco mostraron los síntomas observados en los cultivares comerciales de *A. comosus*.

Figura 9. Síntomas de la enfermedad de la "marchitez de la piña" en cercas vivas formadas por plantas de *B. pinguin* (piña ratón) en fincas del municipio de Banes, Holguín, junio del 2009. **A**: cerca de Banes, Holguín, con enrojecimiento foliar y marchitez, **B:** enrojecimiento de la roseta, **C**: la necrosis y torcedura hacia abajo de las puntas de las hojas y **D**: cerca del municipio Los Palacios, Pinar del Río, de plantas de piña ratón sin síntomas de MWP.

No obstante a la observación de los síntomas característicos de la MWP, tanto en los cultivares comerciales como en *B. pinguin*, la presencia de los insectos transmisores del complejo viral son evidencias que reforzarían la presencia de la enfermedad en las fincas visitadas. Por tal motivo, durante las prospecciones se investigó la presencia de los insectos relacionados en la literatura a la enfermedad MWP.

En todas las fincas examinadas se encontraron poblaciones de cochinillas, y todos los individuos colectados mostraron características morfológicas de cuerpo relleno, convexo y de color rosado. Los filamentos cerosos laterales midieron menos de un cuarto del ancho del cuerpo del insecto, aunque los filamentos de la parte posterior midieron en algunos individuos hasta la mitad del cuerpo. En todos los individuos examinados se contaron 17 pares de filamentos en el cuerpo de los insectos. La presencia de las cochinillas colectadas coincidió con la observación de manchas verdes oscuras y pardas en las hojas de las plantas.

La morfología de los insectos colectados se correspondió con la descrita para la cochinilla rosada (*Dysmicoccus brevipes* Cockerell) por Martínez-Rivero *et al*. (2010). Este resultado refuerza la afirmación de la presencia de síntomas característicos de MWP en las fincas prospectadas. Sin embargo, una información imprescindible para implementación o no de medidas de manejo de una enfermedad, es la presencia e incidencia de sus síntomas en las áreas comerciales, aspecto que se aborda a continuación.

En las 24 plantaciones del cv. 'Española roja' evaluadas (Tabla 2), localizadas en las tres regiones geográficas de Cuba (Figura 10 A), se observaron plantas con los síntomas característicos de la MWP, descritos anteriormente. En total se observaron 894 142 plantas, de las cuales el 34,6 % (332 695 plantas) presentaron todos los síntomas de MWP. Las incidencias se analizaron estadísticamente mediante una comparación múltiple de proporciones por el método de Wald, para un nivel de confianza de $p<0,05$, y se utilizó el software estadístico CompaProWin_2.0.1, desarrollado por el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA, Cuba).

La incidencia de plantas con síntomas de MWP en el 25 % de las áreas (6/24) fue alta o muy alta, [mayores al 85 %], como en La Habana, Villa Clara, Granma, Santiago de Cuba y Guantánamo (Figura 10 B: LH, VC1, VC2, VC5, SC2, GT1). El 29 % de las plantaciones (7/24) mostró incidencia media, [6 % - 85 %], como en fincas de Pinar del Río, Artemisa, Camagüey, y la Isla de la Juventud (Figura 10 B: PR3, PR2, AR, IJ1, IJ2, IJ3, y CM2). En el restante 46 % de las plantaciones (11/24) la incidencia fue baja [inferior al 6 %], característica de algunas fincas de las provincias Pinar del Río, Matanzas, Villa Clara, Ciego de Ávila, Camagüey, Granma, Santiago de Cuba y Guantánamo (Figura 10 B: PR1, MT1, MT2, VC3, VC4, CA, CM1, CM2, GR, SC1 y GN2).

Los valores de la incidencia de plantas con síntomas de MWP contrastaron en algunas de las áreas productoras inspeccionadas de una misma localidad (Figura 10 A). En el municipio Corralillo, provincia Villa Clara, en junio de 2010, se observaron áreas con incidencias inferiores al 6% (Figura 10 A: fincas VC3: 5,40 % y VC4: 2,40 %), las cuales difirieron de los valores registrados en las fincas VC1, VC2 y VC5, en las que se contabilizaron valores de 99 %; 98 % y 90,20 %, respectivamente. En el municipio Niceto Pérez de Guantánamo, la finca GT1 mostró el 100 % de sus plantas con síntomas de MWP, y se encontró distante en 3 km aproximadamente de GT2, con 0,01 % de incidencia (Figura 10 A). En Los Palacios, Pinar del Río, y Santa Cruz, Camagüey, se observaron situaciones similares.

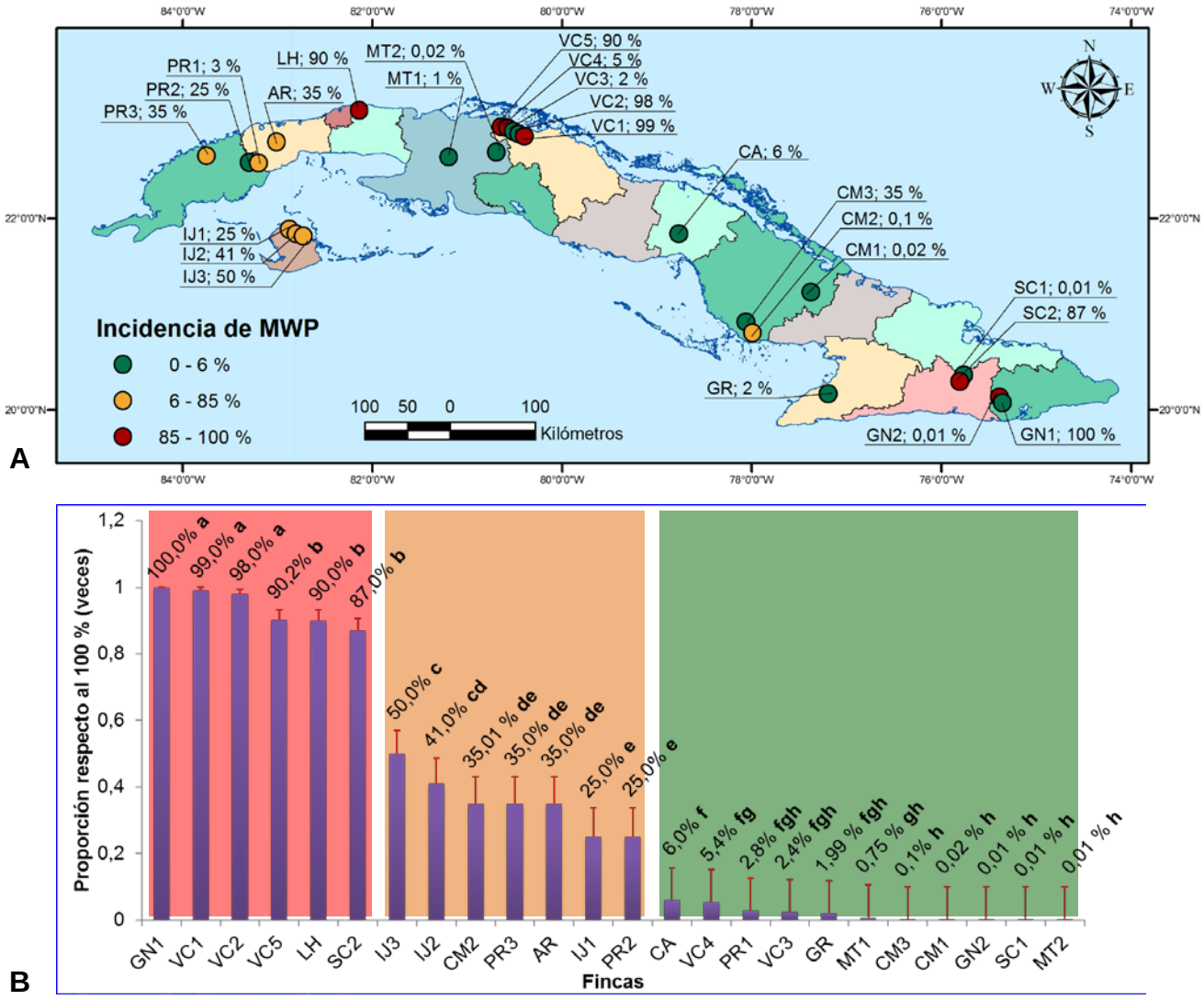


Figura 10. Localización geográfica e incidencia (**A**) de plantas con síntomas de "marchitez de la piña" observadas en las plantaciones comerciales del cv. 'Española roja' prospectadas durante este estudio en el periodo 2009-2012, y comparación de los valores de incidencias (**B**). **IJ1**, **IJ2** e **IJ3**: Isla de la Juventud; **PR1**, **PR2**: Los Palacios y **PR3** Viñales, Pinar del Río; **AR**: Candelaria, Artemisa; **LH**: Habana del Este, La Habana; **MT1**: Los Arabos y **MT2**: Jagüey Grande, Matanzas; **VC1**, **VC2**, **VC3**, **VC4** y **VC5**: Corralillo, Villa Clara; **CA**: Ciego de Ávila; **CM1**: Guáimaro, y **CM2**, **CM3**: Santa Cruz, Camagüey, **GR**: Campechuela, Granma; **SC1** y **SC2**: San Luis, Santiago de Cuba; **GN1** y **GN2**: Niceto Pérez, Guantánamo.

Los síntomas que se encontraron durante este estudio en los cultivares 'Española roja' y 'Cayena lisa' se correspondieron con los característicos de la marchitez de la piña del cv. 'Cayena lisa' en México y Hawái (Sether y Hu, 2002a; Ochoa-Martínez *et al*., 2016), y en clones de este mismo cultivar en Australia (Gambley *et al*., 2008a). Asimismo, coincidieron con los observados en plantas de piña cv. 'Cayena lisa', en Ciego de Ávila, Cuba, en 1998 (Borroto *et al*., 1998). Sin embargo, los síntomas fueron diferentes a los observados en plantas del cv. 'Vitória' ('Española roja' x 'Cayena lisa') en Brasil, que no incluyeron la coloración rojiza de las hojas (Freitas-Ferreira *et al*., 2014).

En este estudio se constató que en los cvs. 'Española roja' y 'Cayena lisa', el patrón de síntomas fue diferente respecto al observado en el cv. 'MD-2' en Cuba. Si bien en los tres

cultivares ocurrió necrosis de la punta de las hojas y su curvatura hacia abajo, así como flacidez y marchitez de estas, en el cv. 'MD-2' no se desarrolló enrojecimiento foliar, marcadamente visible en los cv. 'Española roja' y 'Cayena lisa'. Además, el enrojecimiento foliar en el cv. 'MD-2' también se describió como un síntoma de MWP en Ecuador y México, lo que no coincidió con los resultados descritos en esta investigación (Alvarez *et al*., 2015; Ochoa-Martínez *et al*., 2016).

Este resultado diferencial en los patrones de síntomas observados entre el cv. 'MD-2' plantado en Cuba, y los informados en este mismo cultivar en Ecuador y México, y entre los cv. 'Española roja' y 'Cayena lisa' en Cuba, y el cv. 'Vitória', en Brasil, pudiera explicarse por las diferentes condiciones edafoclimáticas en las cuales se desarrollaron estos cultivos. Se han descrito diferencias en los síntomas de MWP inducidos en plantas de piña cv. 'Cayena lisa', plantadas en diferentes regiones geográficas, en las que se indujeron tonos menos rojizos, incluso amarillentos, dependiendo del país en que se plantaron (Py, 1987).

Las diferencias observadas durante este estudio entre los síntomas de los cv. 'Española roja' y 'Cayena lisa', respecto al cv. 'MD-2', se pueden explicar por la composición genética de cada uno, en su interacción con el medio ambiente, tanto con los factores bióticos, como abióticos. Varios estudios de variabilidad de izoenzimas o filogenéticos, mostraron diferencias que dividieron los cultivares de piña en cinco grupos genéticamente diversos: 'Cayena', 'Queen', 'Española', 'Perolera' y 'Pernambuco' (Py, 1987; Paul y Duarte, 2011). En este sentido, estudios de diversidad genética del germoplasma de piña de Cuba mostraron una variabilidad suficiente para diferenciar los grupos descritos anteriormente (Yanes *et al*., 2012).

Estas diferencias genéticas en los cultivares de *A. comosus var. comosus* explican el desarrollo de síntomas de MWP con diferentes grados de severidad (Py, 1987). Mientras que el cv. 'Española roja' se considera medianamente tolerante a la MWP, el cv. 'Cayena lisa' es altamente susceptible. El cv. 'MD-2' a su vez, se considera menos susceptible a la MWP que el cv. 'Cayena lisa' (Paull y Duarte, 2011). El cv. 'MD-2' es un híbrido que tiene entre sus parentales al cv. 'Cayena lisa', pero además en su genotipo tiene contribuciones de los cv. 'Smooth Guatemala', 'Pernambuco', 'Ruby' y 'Queen' (Bartholomew, 2009).

El desarrollo de la MWP se caracteriza por transcurrir en cuatro etapas de acuerdo al desarrollo de los síntomas en las plantas (Py, 1987; Sether y Hu, 2002a). Durante este estudio se observaron en todas las áreas de piña del cv. 'Española roja', plantas con síntomas similares a los característicos de la MWP en sus diferentes estadios de desarrollo. Sin embargo, el diagnóstico visual de la enfermedad no se realizó con la misma facilidad en las plantas que se encontraron en diferentes etapas de desarrollo de los síntomas.

La identificación de las plantas que se encontraron en la primera etapa de desarrollo de la MWP, en la cual sólo se observa enrojecimiento en las hojas fue confusa, por lo que carece de valor diagnóstico de la enfermedad. En las fincas inspeccionadas fue frecuente la presencia de factores bióticos (alta infestación con cochinillas, *Phyllophaga* spp., y presencia de enfermedades fungosas) y abióticos (estrés hídrico y falta de fertilización) afectando las plantas evaluadas. Estos factores, al inducir síntomas similares a los de la MWP, dificultan el diagnostico visual de esta enfermedad en esta fase de su desarrollo.

De la misma forma, los hijos de piña cvs. 'Española roja' y 'Cayena lisa' recién plantados, al no tener desarrollado su sistema radicular en el periodo de adaptación al campo, se mantienen con síntomas de enrojecimiento y marchitez (Bartholomew *et al*., 2013). Los propágulos del cv. 'MD-2' al plantarse no desarrollan síntomas de enrojecimiento, pero si se observan con

marchitez y con la punta de las hojas secas (Rodríguez *et al*., 2016). Esta característica en los tres cultivares persiste hasta que se adaptan a las nuevas condiciones de cultivo, y al ser semejantes a los inducidos por la MWP en la primera etapa de la enfermedad, imposibilitan el diagnóstico visual de plantas en este estadio temprano.

Por otro lado, el enrojecimiento de las hojas de piña es consecuencia de la síntesis de pigmentos, principalmente antocianinas. Esta respuesta no es específica de la MWP, sino que puede ser provocado por otras situaciones de estrés, como la sequía y las altas temperaturas (Fitter y Hay, 1987). En Ghana, África, se describió un síndrome denominado enfermedad del enrojecimiento de la hoja de la piña (RLD, del término en inglés *red leaf disease*), cuyos síntomas son similares a los de la MWP. La etiología de esta enfermedad se asoció a la respuesta fisiológica de las plantas sometidas a altas intensidades de luz solar, y no a un factor biótico (Awuah y Adzim, 2004).

En este sentido, la observación visual de los patrones de grupos de plantas con síntomas en las plantaciones, rodeadas por plantas asintomáticas, fue una herramienta que permitió distinguir la presencia de la MWP de otras afectaciones como factores abióticos (en este caso, sequía), y por lo tanto tuvo valor diagnóstico. Varios estudios han demostrado estadísticamente el patrón agregado de las plantas con síntomas de MWP, lo que refuerza el valor diagnóstico de este patrón (Hughes y Samita, 1997; Sether y Hu, 2002b; Sether *et al*., 2010). Este patrón está estrechamente relacionado con el comportamiento agregado de dispersión de las cochinillas (Hughes y Samita, 1997).

En el segundo estadio de la enfermedad, además de enrojecimiento foliar, la necrosis y la curvatura de la punta de las hojas hacia abajo, facilitaron el diagnóstico visual de plantas con síntomas de la MWP. No obstante, la presencia de factores bióticos como son las infecciones fungosas o las infestaciones por insectos y nematodos que al dañar el sistema radicular, pudieran inducir síntomas confundibles con los de MWP (Freitas-Ferreira *et al*., 2014).

Sin embargo, la presencia de enfermedades fungosas en las plantas de piña es distinguible de la MWP por la presencia de otras características como las pudriciones y olores de putrefacción. Ejemplo de ello son las pudriciones causadas por la fusariosis de la piña, debido al hongo *Fusarium guttiforme* (Carnielli *et al*., 2014), y el oomiceto *Phytophthora parasítica* (Bartholomew *et al*., 2003). El desarrollo de la marchitez generalizada en las plantas, con la exclusión de infecciones fungosas e insectos, fue el estadio de MWP distinguible con mayor facilidad en este estudio.

La búsqueda de plantas no comerciales de la familia *Bromeliaceae* con potencialidades de ser hospedantes naturales con importancia epidemiológica se centró en la piña ratón (*B. pinguin*) y piña enana de jardín (*A. ananassoides*). En *B. pinguin* se observaron síntomas similares a los inducidos en cultivares comerciales con MWP. Las plantas de *A. ananassoides* inspeccionadas no mostraron síntomas de MWP. Estas plantas se muestrearon para determinar de la infección por los ampelovirus, resultados que se discutirán posteriormente.

Las prospecciones realizadas para la identificación de insectos vectores en las plantaciones indicaron la presencia únicamente de la especie *D. brevipes* (cochinillas rosadas), en todas las áreas evaluadas, asociada a síntomas de manchas parduzcas en la base de las hojas. Las cochinillas al alimentarse en las plantas producen daños mecánicos que causan la aparición de manchas cloróticas (Sether y Hu, 2002a).

Sin embargo, como anteriormente se ha referido, los virus asociados a la MWP son transmitidos también por las cochinillas grises (*D. neobrevipes*) (Sether *et al*, 1998). (Mur-

Rodríguez *et al*., 2015). Otros estudios realizados en Cuba, tanto en plantaciones de piña del cv. 'Española roja', del cv. 'MD-2' u otras plantas de interés agrícola, solo han mostrado la presencia de *D. brevipes* en una amplia gama de hospedantes (Blanco *et al*., 2003; Martínez *et al*., 2008; Martínez-Rivero *et al*., 2010; Mur-Rodríguez *et al*., 2015). En necesario realizar estudios más profundos sobre los factores que pudieran influir en que la cochinilla gris (*D. neobrevipes*) no se encuentre en Cuba.

En el presente estudio, se encontraron plantas con los síntomas de MWP en las 24 plantaciones inspeccionadas, y los valores de incidencia variaron desde 0,01 % (solamente en dos fincas) hasta valores que incluso alcanzaron el 100 %. Tomando en cuenta el número total de plantas inspeccionadas en las prospecciones y la representatividad alcanzada, puede decirse que la enfermedad MWP se encuentra distribuida en todo el país.

Los valores de incidencia de plantas con síntomas de MWP fueron superiores a los encontrados en plantaciones de 'Cayena lisa' en Benin, Sudáfrica [69 % en el 2014 y 78 % en el 2015] (Houndédji *et al*., 2016) y en Hawái [25 %-35 % en el 2000] (Sether y Hu, 2002a). Sin embargo, en otros países como Uganda, África, se informaron en el 2011 incidencias de plantas con síntomas de la enfermedad que variaron entre 15 % y 95 % (Bua *et al*., 2013), similares a los registrados en las prospecciones realizadas en este estudio en Cuba.

Los valores de incidencia de plantas con síntomas fueron variables y contrastantes en algunas regiones (ej. Las fincas de Corralillo, provincia Villa Clara). Esta heterogeneidad pudiera deberse a la influencia de factores como las condiciones climáticas y el estado nutricional de las plantas (Singh y Sastry, 1995), la irrigación (Sether y Hu, 2001a), la interacción con otros patógenos (Sipes *et al*., 2002; Freitas-Ferreira *et al*., 2014) y la sensibilidad varietal (Py, 1987; Rohrbach y Johnson, 2003). Otras condiciones como el conocimiento de los productores sobre la enfermedad y su manejo (Bua *et al*., 2013; Houndédji *et al*., 2016), la edad de las plantaciones (Gambley y Thomas, 2015; Houndédji *et al*., 2016) y el reciclado del material de propagación (Bua *et al*., 2013) pueden haber determinado estos resultados.

Varios de los factores antes mencionados son frecuentes en la mayoría de las áreas de este cultivo en Cuba (Isidrón *et al*., 2003). Otras condiciones como el uso de material de propagación de diferentes procedencias y la utilización de diferente manejo agronómico en las fincas prospectadas en una misma región, pueden ser determinantes en la diseminación de la enfermedad (Sether *et al*., 2010). Por otra parte, en las áreas montañosas del municipio Niceto Pérez de Guantánamo, las condiciones edafoclimáticas pueden ser diferentes en localidades cercanas, incluso próximas hasta 5 km, lo que influye directamente en la expresión de los síntomas de MWP, como anteriormente se comentó.

Algunas de las fincas donde se encontraron plantaciones con elevada incidencia de la enfermedad, se clasifican como regiones de elevada importancia en el cultivo de la piña, por la extensión de la superficie cultivada y su producción. Un ejemplo fueron las tres fincas de Corralillo, Villa Clara, provincia que alcanzó una producción total en el 2016 de 6 894 t de piña, de las 39 981,9 t totales producidas en el país (Colectivo de autores, 2016). Además del daño económico asociado a la alta incidencia de MWP, la extensión de estas fincas potencia su relevancia epidemiológica al convertirse en focos de propagación de vectores y virus.

En la actualidad, en Cuba se encuentran áreas comerciales del cv. 'Española roja' dispersas en todo el país (Isidrón *et al*., 2003; y resultados de este estudio), y plantaciones del cv. 'MD-2' de alto valor para la exportación de fruta fresca a mercados extranjeros desde Ciego de Ávila (Rodríguez *et al*., 2012; López-Hernández y Domínguez-Martín, 2013). Además, existen otros

cultivares como 'Cayena lisa' (Isidrón *et al*., 2003; y resultados de este estudio), que aunque con una limitada extensión, satisfacen el mercado de este importante alimento en regiones como Granma. En general, en todas las localidades donde se cultiva este frutal, se generan tanto importantes recursos alimentarios y financieros como numerosos empleos.

En Cuba las pérdidas asociadas a la enfermedad MWP, pueden provocar la disminución de los rendimientos de hasta el 40 % de la cosecha, según estimaciones teóricas (Colectivo de autores, 1989). La MWP ha provocado pérdidas entre 35 % y 55 % de los rendimientos en las cosechas en plantaciones de piña de Hawái y Australia (Sether *et al*., 2002b; Gambley *et al*., 2008a). La información referida anteriormente y los resultados de incidencia de la enfermedad obtenidos durante el desarrallo de esta investigación, sugieren que la MWP pudiera tener un impacto mayor sobre la industria de la piña en Cuba que el dato estimado teóricamente.

La identificación y descripción de los síntomas asociados a una enfermedad en cada cultivar y región, constituyen una herramienta importante para la toma de medidas de manejo, específicamente para la eliminación oportuna de fuentes primarias de inóculo. Sin embargo, la falta de conocimiento de los agricultores para diferenciar los síntomas de las enfermedades virales, que tienden a confundirlos con los ocasionados por otros factores como los abióticos, disminuye la efectibilidad de estas medidas de manejo (Islam, 2017).

Los resultados obtenidos durante esta investigación mostraron una amplia presencia en el país de síntomas de MWP en los cultivares comerciales y en la especie *B. pinguin*, así como la presencia única del vector potencial, la cochinilla rosada. La prospección realizada indicó una amplia presencia de síntomas de MWP en Cuba, lo que pudiera indicar una amplia diseminación de los agentes virales asociados a la MWP, hipótesis sustentada además por el informe previo de PMWaV-2 en plantas de Ciego de Ávila (Borroto *et al*., 2007). Para determinar la presencia de agentes virales se tomaron muestras en cada finca prospectada (Tabla 2), y de cada una se registraron los síntomas que mostraron en el momento de la evaluación. Sin embargo, primeramente fue necesario optimizar métodos para su diagnóstico, y caracterizar aislados que permitieran contar con controles positivos de estos agentes.

V.2.2 Identificación de los ampelovirus PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en los ecosistemas productivos de piña prospectados

El objetivo de esta etapa fue investigar la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en Cuba. Los virus PMWaV-4 y PMWaV-5 no se diagnosticaron debido a que se informaron de forma muy exclusiva en Hawái y Australia y a la ausencia de evidencias que los relacionen con los síntomas de MWP (Gambley y Thomas, 2015).

La selección de los aislados para el diagnóstico de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en plantas colectadas durante las prospecciones (epígrafe V.2.1, Tabla 2) se realizó según: (1) presencia de los síntomas de MWP e insectos vectores potenciales en las plantas, (2) colecta en regiones geográficas diferentes, priorizando Ciego de Ávila por la detección previa de closterovirus y PMWaV-2 (Borroto *et al*., 1998, 2007), (3) plantas del cv. 'Española roja' y 'MD-2' por ser los cultivares con mayor importancia comercial actualmente y (4) plantas de las especies de *A. ananassoides* y *B. pinguin* (posibles hospedantes alternativos) (Tabla 3).

Como controles negativos en todos los experimentos se utilizaron extractos de ARN de vitroplantas de piña cv. 'MD-2', donadas por el Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila. Estas plantas se obtuvieron a partir de meristemos limitando su tamaño de forma tal que se

eliminara cualquier patógeno de origen viral contenido en las fuentes de los mismos. Como blanco experimental se utilizó agua destilada dos veces (H_2Odd).

Tabla 3. Plantas utilizadas para la evaluación de la RT-PCR-HSP70h para PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 (RT-PCR-HSP70h) y la caracterización molecular de aislados de estos virus.

Origen	Finca (código)	Hospedante	Colecta	Plantas
Isla de la Juventud	La Isabel 1, IJ1	'Española roja'	06/2009	IJ1 ER-1 a -4
Pinar del Río	Los Palacios, PR2	*B. pinguin*	10/2011	PR2 BP-1 a -4
La Habana	Habana del Este, LH	*A. ananassoides*	01/2010	LH AA-1 y -2
La Habana	Habana del Este, LH	'Española roja'	01/2010	LH ER-1 a -5
Ciego de Ávila	La piña, CA	'MD-2'	10/2010	CA MD2 (-2, -4, -5 y -7)
Ciego de Ávila	La piña, CA	*B. pinguin*	01/2012	CA BP-1 a -4
Ciego de Ávila	La piña, CA	*A. ananassoides*	01/2012	CA AA-1 y -2
Holguín	Banes, HG	*B. pinguin*	08/2010	HG BP-1 a -4

Los extractos de ARN total de las plantas se obtuvieron con el método del *TRIzol® reagent* (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.). Como fuente de tejido se utilizó 100 mg de la parte etiolada de la base de las hojas, de acuerdo con Dey *et al*. (2012). Los tejidos se maceraron en morteros de porcelana con nitrógeno líquido y se mezcló con 1 mL de *TRIzol.* Posteriormente, se centrifugó a 12 000 g durante 5 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se le adicionaron 200 µL de cloroformo a la fase acuosa y se centrifugó a 12 000 g durante 15 min. Se extrajo la fase acuosa y el ARNt se precipitó con 300 µL de NaCl (1 M) y 400 µL de isopropanol y centrifugación durante 10 min a 12 000 g.

El precipitado se lavó con etanol al 75 %, y se guardó a -50 °C en 1 mL de etanol absoluto. Para su uso en el diagnóstico, se centrifugó a 12 000 g durante 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se secó durante 15 min. Posteriormente, se resuspendieron en 50 µL de agua doble destilada (H_2Odd) tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La calidad de los extractos se determinó por la observación visual de la integridad de las bandas de los ARN ribosomales 28S y 16S, en electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % (p/v) de 5 µL del extracto, con tinción de bromuro de etidio a 0,5 mg/mL según Sambrook *et al*. (1989). Los geles se corrieron en tampón TAE 1X (Tris acetato 0,04 M; EDTA 0,001 M; pH 8), 60 V. Todos los aditamentos usados para la electroforesis se trataron previamente con SDS 20 % durante 30 min y tres enjuagues con H_2Odd.

V.2.2.1 Detección de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 mediante RT-PCR-HSP70h

El diagnóstico específico de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 se realizó mediante reacciones de RT-PCR para la amplificación de un fragmento del gen que codifica la proteína HSP70h (RT-PCR-HSP70h) de cada especie viral con los pares de cebadores 225/226 [PMWaV-1], 223/224 [PMWaV-2] y 263/264 [PMWaV-3], diseñados por Sether *et al*. (2005a) (Tabla 4).

La síntesis de las cadenas de ADNc se realizó mediante reacciones de reverso-transcripción (RT) con el sistema *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Previo a la RT, los cebadores (0,4 µM) se mezclaron con 5 µL del extracto de ARN en un volumen final de 12,5 µL, se hibridaron a 65 °C durante 10 min y enfriamiento 5 min a 4 °C. Seguidamente, se adicionó la mezcla de la

reacción de RT (5 U de Protector de RNasa; DTT 5 mM; dNTPs 0,2 mM, y H_2Odd), en un volumen final de 25 µL. La RT se desarrolló durante 60 min a 42 °C, siguiendo 10 min de inactivación de la enzima a 65 °C y 5 min de enfriamiento a 4 °C.

Tabla 4 Cebadores para la detección de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 (Sether *et al*., 2005a).

Virus	Cebador: secuencia 5'-3'	Sitios de hibridación (5'-3')[a]
PMWaV-1	**225**: ACAGGAAGGACAACACTCAC **226**: CGCACAAACTTCAAGCAATC	8 386 nt-8 976 nt
PMWaV-2	**224**: CATACGAACTAGACTCATACG **223**: CCATCCACCAATTTTACTAC	8 155 nt-8 765 nt
PMWaV-3	**263**: ATTGATGGATGTGTATCG **264**: AGTTCACTGTAGATTTCGGA	7 004 nt-7 503 nt

[a]Posiciones relativas al genoma de los aislados de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 de Hawái.

La PCR se realizó a partir de 5 µL del ADNc con el sistema *Top Taq Master Mix Kit* (QIAGEN), según las recomendaciones del fabricante. Las condiciones de la PCR para la RT-PCR-HSP70h fueron las propuestas por Sether *et al*. (2005a) (5 min de desnaturalización a 95 °C, 45 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min de hibridación de los cebadores a 55 °C, 2 min de polimerización a 72 °C y 10 min de extensión final a 72 °C). Los productos de la RT-PCR-HSP70h se chequearon mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % (p/v), con tinción de bromuro de etidio a 0,5 mg/mL según Sambrook *et al*. (1989). Los geles se corrieron en tampón TAE 1X (Tris acetato 0,04 M; EDTA 0,001 M; pH 8), a 100 V durante 30 min.

El análisis por la RT-PCR-HSP70h (amplicón HSP70h) de las plantas seleccionadas como fuentes de aislados, reveló la amplificación de bandas con talla superior a los 500 pb con los cebadores 225/226 [detección de PMWaV-1] (Figura 11 A, carriles 1, 2 y 4). En el ensayo con los cebadores 223/224 [detección de PMWaV-2], se evidenció la amplificación de bandas con una talla superior a los 600 pb (Figura 11 B, carriles 1 y 4), y aproximada a los 500 pb con el

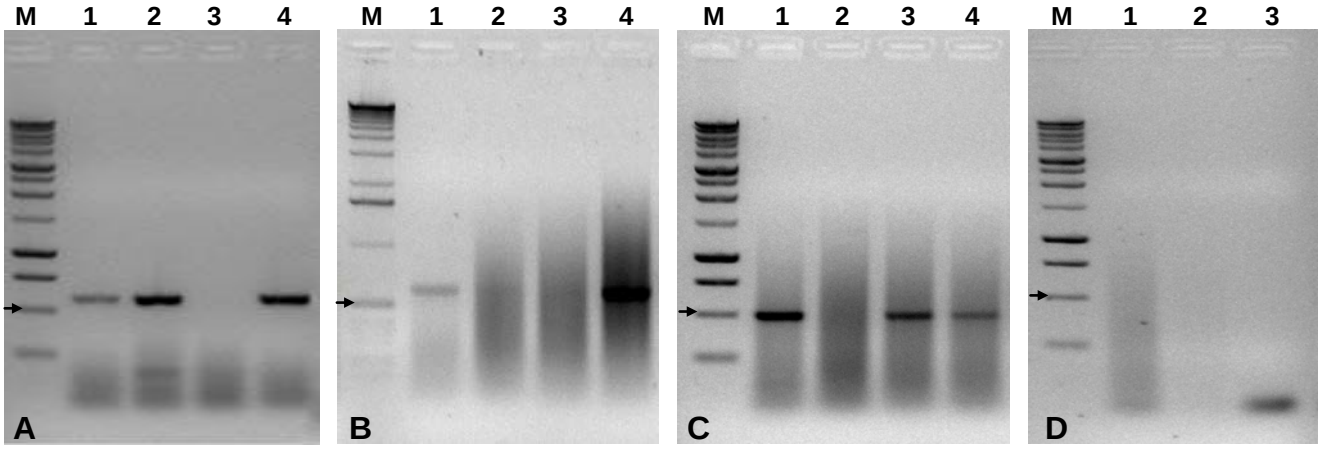


Figura 11. Productos de amplificación de los ensayos RT-PCR-HSP70h para la detección de PMWaV-1 (**A**: cebadores 225/226), PMWaV-2 (**B**: 223/224) y PMWaV-3 (**C**: 263/264), a partir de extractos de plantas de piña cv. 'MD-2' de Ciego de Ávila. Carriles **1-4**: plantas CA MD2-2, CA MD2-5, CA MD2-7 y CA MD2-4. **M**: marcador de peso molecular escalera de 1 kb (Promega) (**A**, **C** y **D**) y de 100 pb (Promega) (**B**) [las flechas indican la banda de 500 pb]. **D**: Controles negativos (extracto de planta cv. 'MD-2' obtenida por cultivo *in vitro* de meristemos), de cada ensayo (Carriles **1-3**, PMWaV-1 al -3).

par 263/264 [específicos para PMWaV-3] (Figura 11 C, carriles 1, 3 y 4).

En ninguno de los tres ensayos se verificó amplificación a partir del extracto de ARN de una planta de piña 'MD-2' por cultivo *in vitro* de meristemos (Figura 11 D). Los análisis mostraron la presencia de infecciones simples (PMWaV-2: CA MD2-5 y PMWaV-3: CA MD2-7) o mixtas (PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3: CA MD2-2 y CA MD2-4) en las plantas analizadas (Tabla 5). El análisis de las muestras seleccionadas de La Habana y la Isla de la Juventud evidenció la presencia de estos virus, aunque en esta última localidad no se detectó PMWaV-1.

En la RT-PCR-HSP70h a partir de los extractos de las plantas posibles hospedantes alternativos, sólo se amplificó una banda con una talla aproximada a 600 pb en los extractos de las plantas de *B. pinguin*, utilizando los cebadores 223/224 [detección de PMWaV-2] (resultados no mostrados). Ninguna de las cuatro plantas de *A. ananassoides* analizadas mostró la amplificación de los fragmentos HSP70h. Sin embargo, a partir de las 12 plantas de *B. pinguin* (cuatro de Pinar del Río, cuatro de Banes, Holguín y cuatro de Ciego de Ávila) se amplificaron los productos esperados (Tabla 5).

Tabla 5. Diagnóstico mediante RT-PCR-HSP70h de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en las plantas seleccionadas para la obtención de aislados. IJ1: Isla de la Juventud, finca 1; PR2: Pinar del Río, Los Palacios, finca 2; LH: La Habana, Habana del Este; CA: Ciego de Ávila, La Piña; HG: Holguín, Banes; ER: 'Española roja', BP: *B. pinguin*, AA: *A. ananassoides,* MD2: 'MD-2'.

Planta	Infección PMWaV[a]			Aislado seleccionado
	1	2	3	
IJ1 ER-1	-	+	-	-
IJ1 ER-2	-	+	+	PMWaV-2 IJ1 ER-2, PMWaV-3 IJ1 ER-2
IJ1 ER-3	-	-	+	-
IJ1 ER-4	-	+	+	-
PR2 BP-1	-	+	-	-
PR2 BP-2	-	+	-	-
PR2 BP-3	-	+	-	-
PR2 BP-4	-	+	-	-
LH ER-1	+	+	+	PMWaV-2 LH ER-1
LH ER-2	+	-	-	-
LH ER-3	-	+	-	PMWaV-1 LH ER-3
LH ER-4	-	+	-	-
LH ER-5	-	+	+	-
LH AA-1	-	-	-	-
LH AA-2	-	-	-	-
CA MD2-2	+	+	+	PMWaV-2 CA MD2-2, PMWaV-3 CA MD2-2
CA MD2-5	+	-	-	-
CA MD2-4	+	+	+	PMWaV-1 CA MD2-4
CA MD2-7	-	-	+	-
CA BP-1	-	+	-	-
CA BP-2	-	+	-	-
CA BP-3	-	+	-	-
CA BP-4	-	+	-	-
CA AA-1	-	-	-	-
CA AA-2	-	-	-	-
HG BP-1	-	+	-	-
HG BP-2	-	+	-	-
HG BP-3	-	+	-	PMWaV-2 HG BP-3
HG BP-4	-	+	-	-

[a] + y -: resultado positivo y negativo en el diagnóstico mediante la RT-PCR-HSP70h.

Las tallas de los amplicones HSP70h obtenidos coincidieron con las esperadas de 590 pb (PMWaV-1), 610 pb (PMWaV-2) y 490 pb (PMWaV-3), para la amplificación de fragmentos del gen *hsp70h* con el uso de los cebadores, diseñados por Sether *et al*. (2005b). Estas evidencias sugirieron la detección de los virus PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en las muestras analizadas. Sin embargo, para poder afirmar la identidad de los amplicones obtenidos con la de estos virus fue necesaria la caracterización molecular de los mismos.

Para continuar con los estudios de caracterización, se seleccionó un amplicón de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 a partir de las plantas de Ciego de Ávila, que nombraron tentativamente PMWaV-1 CA MD2-4, PMWaV-2 CA MD2-2 y PMWaV-3 CA MD2-2 (Tabla 5). Además, se seleccionaron amplicones de plantas del cv. 'Española roja' de la Isla de la Juventud (PMWaV-2 IJ1 ER-2 y PMWaV-3 IJ1 ER-2), y del mismo cultivar de La Habana (PMWaV-1 LH ER-3 y PMWaV-2 LH ER-1). Asimismo, se seleccionó una de las plantas de *B. pinguin* de Banes, Holguín (PMWaV-2 HG BP-3).

V.2.2.2 Caracterización molecular de aislados de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3

V.2.2.2.1 Amplificación del gen *cp* de los aislados seleccionados

La especificidad de las reacciones de RT-PCR-HSP70h en la detección de los fragmentos de los genomas de los ampelovirus ensayados se determinó mediante la caracterización molecular de una selección de aislados de las tres epecies virales obtenidos a partir de las plantas en las que se obtuvieron los amplicones HSP70h en el epígrafe anterior (0).

La selección de los aislados a caracterizar se realizó tomando en cuenta: (1) provincias alejadas de Ciego de Ávila o cultivares diferentes de 'Cayena lisa', (2) plantas de las especies de *A. ananassoides* y *B. pinguin* (posibles hospedantes alternativos) y (3) talla de los amplicones obtenidos en las reacciones de RT-PCR-HSP70h similar a la esperada. Los productos a caracterizar se nombraron con el acrónimo del virus para el cual están diseñados los cebadores con los que se obtuvieron, seguido del código utilizado para la planta muestreada (según epígrafe V.2.1). El acrónimo del virus se utilizó para facilitar la comprensión del documento, pero hasta que no se determinó la identidad nucleotídica de los mismos, no se nombraron como aislados de los virus en caracterización.

La amplificación del gen de la proteína de cápside viral (cp) de los aislados seleccionados para caracterizar se realizó mediante reacciones de RT-PCR (RT-PCR-CP), con los cebadores: CP225/CP226, CP223/CP224 y CP263/CP264 (Tabla 6). Estos cebadores se diseñaron en este estudio con el objetivo de caracterizar este gen y su posterior sub-clonaje en vectores de expresión heteróloga de proteínas. Los mismos se diseñaron a partir de las secuencias de los aislados de Hawái de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3, respectivamente (Anexo 2).

El diseño de los cebadores se realizó con las herramientas del programa bioinformático VECTOR NTi v.8.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se tomaron en consideración los parámetros de formación de estructuras secundarias, porcentaje de bases G y C en la secuencia, formación de dímeros, porcentajes de complementariedad con las secuencias diana y temperaturas de hibridación entre los cebadores similares. Sin embargo, la inclusión de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' de las secuencias de los cebadores foward (5') y reverse (3'), respectivamente, redujo la calidad de algunos de los parámetros evaluados para su diseño.

La síntesis de las cadenas de ADNc (RT) en la RT-PCR-CP se realizó de forma similar a la RT-PCR-HSP70h (epígrafe 0). El programa de PCR constó de 2 min de desnaturalización a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 45 seg de hibridación de los cebadores a 55 °C y 1 min a 72 °C, y posterior extensión de 10 min a 72 °C. Los productos se chequearon en electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) con tinción de bromuro de etidio a 0,5 mg/mL según Sambrook et al. (1989).

Tabla 6. Cebadores para la amplificación del gen *cp* de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3.

Virus	Cebador: secuencia 5'-3'	Sitios de hibridación en el genoma (5'-3')[b]
PMWaV-1	**CP226:** GAGCTCATGGCTGATTCGAGCAAAC[a] *Sac*I **CP225**: GAGCTCTTATTTGCGTCCACCCATAAAG *Sac*I	11 502 nt-12 276 nt
PMWaV-2	**CP234**: GGATCCATGGCTCAGAATTACGTAGCCG *Bam*HI **CP223**: GGATCCCTACCCTGAAACAGCTCCCTGG *Bam*HI	11 079 nt-11 988 nt
PMWaV-3	**CP264**: GGATCCATGAGTACGATTCCAGTAC *Hind*III **CP263**: AAGCTTTCATCTGCGATTACCTG *Bam*HI	10 249 nt-11 038 nt

[a] Se subrayaron los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción.
[b] Según las secuencias de los genes *cp* de los aislados de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 de Hawái (Anexo 2)

Los ensayos de RT-PCR-CP en las plantas de los cultivares comerciales seleccionadas como fuentes de aislados para caracterizar (Tabla 5), mostraron la amplificación de fragmentos con talla aproximada a los 800 pb (Figura 12, carriles 2-3 y 7-8) con los cebadores específicos para PMWaV-1 y PMWaV-3 (CP263/CP263 y CP225/CP226). Al usar los cebadores CP223/CP224 (PMWaV-2), se amplificó una banda de talla superior a los 800 pb (Figura 12, carriles 4-6). En el ensayo a partir de los extractos de las plantas posibles hospedantes

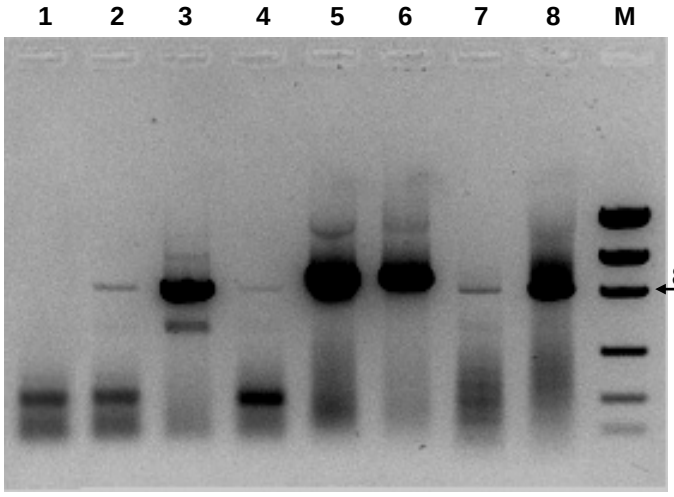


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de amplificación de la CP de PMWaV-1 (carriles: **2** y **3**, cebadores CP225/CP226); PMWaV-2 (carriles **4**-**6**, cebadores CP223/CP224) y PMWaV-3 (carriles **7** y **8**, cebadores CP263/CP264). En los carriles productos de las plantas: **2**- LH ER-3, **3**- CA MD2-4, **4**- IJ1 ER-2, **5**- LH ER-1, **6**- CA MD2-2, **7**- IJ1 ER-2, **8**- CA MD2-2, **1**- Control negativo: planta cv. 'MD-2', de Ciego de Ávila, obtenida por cultivo de meristemos. **M**: marcador de peso *Low Weight Marker* (Invitrogen).

alternativos, se verificó amplificación de una banda con talla superior a los 800 pb a partir de los extractos de *B. pinguin*, usando los cebadores CP223/CP224 (detección de PMWaV-2) (resultados no mostrados). De forma similar a los resultados de la RT-PCR-HSP70h, no se verificó amplificación alguna a partir de los extractos de *A. ananassoides*.

Las tallas de los amplicones obtenidos en la RT-PCR-CP a partir de estas plantas, coincidieron con los tamaños del gen *cp* de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 (789 pb, 774 pb y 909 pb, respectivamente) (Melzer *et al.,* 2001, 2008; Sether *et al.,* 2009). La reacción a partir del extracto de la planta obtenida por cultivo *in vitro* de meristemos resultó negativa (Figura 12, carril 1). Sin embargo, en varios de los productos se observaron bandas con tallas diferentes a las de pesos esperados (Figura 12, carriles 3, 5, 6 y 7).

V.2.2.3 Análisis de las secuencias de los amplicones obtenidos

Los productos de las RT-PCR-HSP70h y RT-PCR-CP se clonaron en vectores comerciales para los posteriores análisis por RFLP y secuenciación. Los amplicones se separaron en electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v), se cortaron las bandas y se purificaron con el sistema Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche). Posteriormente, se ligaron en el plasmidio comercial pGEM®-T Vector (clonaje del amplicón HSP70h de PMWaV-2), o pGEM®-T Easy Vector (todos los demás amplicones HSP70h de PMWaV-1 y PMWaV-3, y CP de los tres ampelovirus) (Promega, Madison, EE.UU.), según las recomendaciones del fabricante.

La identidad de los amplicones obtenidos se determinó con la secuenciación de cuatro clones por cada producto HSP70h y CP clonado, de cada aislado en caracterización, y seleccionados tomando en consideración que sus patrones de RFLP fueran idénticos entre sí y similares a los esperados. Los productos se secuenciaron tanto en dirección *foward* (5'-3') como *reverse* (3'-5') con los cebadores M13F-pUC y M13R-pUC, los cuales hibridan en sitios contenidos en los plasmidios pGEM®-T Vector y pGEM®-T Easy Vector (Anexo 1). Las secuencias se obtuvieron mediante un secuenciador *3730 DNA Analyzer* (Applied biosystems™, Life Technologies, Foster, CA, EE.UU.), utilizando el servicio de Macrogen Inc. (Seúl, Corea).

La secuencia consenso de cada amplicón se obtuvo en el programa VECTOR NTi v.8.0, al alinear las ocho secuencias obtenidas para cada gen amplificado a partir de cada planta. La secuencia consenso de cada amplicón se analizó con la herramienta BLASTN (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul *et al*., 1990), para recuperar de las bases de datos las secuencias que mostraron el menor *e-value* (del inglés: *Expect value* [E]) en el análisis, indicativo de una alta identidad nucleotídica (Anexo 2). La identidad nucleotídica de las secuencias se determinaron mediante el alineamiento con ClustalW del programa MEGA versión 6.06 (Tamura *et al*., 2013). A partir de este acápite, los amplicones caracterizados en las plantas seleccionadas se nombraron como aislados del ampelovirus con el cual mostraron la identidad nucleotídica requerida según los criterios de demarcación de especies en la familia *Closteroviridae* (Martelli *et al*., 2012a), seguido del código de la planta a partir de la cual se colectó el aislado.

Con el objetivo de determinar las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas a partir de los aislados caracterizados y los encontrados en otras regiones del mundo, se reconstruyeron dos árboles filogenéticos basados en los alineamientos de secuencias de los amplicones HSP70h y CP. El árbol filogenético del amplicón HSP70h se reconstruyó extrayendo la región homóloga entre las secuencias de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3, y posteriormente basándose en este fragmento, las de miembros de la familia *Closteroviridae*.

El análisis a partir del amplicón CP se realizó tomando en cuenta los genes completos de la cápside viral homólogas de miembros de la familia *Closteroviridae*.

La reconstrucción de los árboles filogenéticos a partir de los alineamientos generados con el ClustalW de las secuencias del gen *hsp70*h y *cp* se realizó con el programa MEGA versión 6.06 (Tamura *et al*., 2013). Se seleccionó el modelo de sustitución nucleotídica de mayor ajuste a cada grupo de secuencias a analizar (menor valor de BIC, *Bayesian Information Criterion*), que para ambos genes fue el T92+G+I (Tamura 3-parameter, con distribución discreta Gamma [+G], y considerando una fracción de sitios evolutivamente invariables [+I]). Se usó como método estadístico la Máxima Verosimilitud (del inglés: *Maximum Likelihood*), con 1000 repeticiones de remuestreo (*bootstrapping*).

Las secuencias de los amplicones HSP70h (PMWaV-1: 590 nt, PMWaV-2: 610 nt y PMWaV-3: 490 nt) y CP (PMWaV-1: 773 nt, PMWaV-2: 900 nt y PMWaV-3: 789 nt), se depositaron en el GenBank (Anexo 6 y Anexo 7). La comparación entre las secuencias de los amplicones HSP70h PMWaV-1 CA MD2-4 y PMWaV-1 LH ER-3, mostró un porcentaje de identidad nucleotídica de 99,3 % y aminoacídica de 98,5 % (Tabla 7).

En la comparación con las secuencias de este gen de aislados de PMWaV-1 de otras regiones, los porcentajes de identidad nucleotídica variaron entre 91,4 % y 100 %, siendo los mayores valores los verificados con PMWaV-1 AU pF53pmw10 de Australia (Tabla 7). Las identidades aminoacídicas en esta misma comparación variaron entre 94,9 % y 100 %, siendo también los mayores los encontrados con PMWaV-1 AU pF53pmw10.

El estudio comparativo entre las secuencias de los amplicones HSP70h PMWaV-2 CA MD2-2, PMWaV-2 LH ER-1, PMWaV-2 IJ1 ER-2 y PMWaV-2 HG BP-3, mostró porcentajes de identidad nucleotídica y aminoacídica que variaron en los rangos 98,9 % - 99,7 %, y 98,5 % - 100 %, respectivamente (Tabla 7). En la comparación con las secuencias del gen *hsp70h* de aislados de PMWaV-2 de otras regiones, la identidad nucleotídica varió entre 98,4 % y 99,7 %, y la aminoacídica entre 97 % y 100 %. Los mayores valores, tanto de identidad nucleotídica como aminoacídica, se encontraron con las secuencias de los aislados PMWaV-2 TL PJ3 de Tailandia y PMWaV-2 TW PT2 de Taiwán (Tabla 7).

En la comparación entre las secuencias de los amplicones HSP70h PMWaV-3 CA MD2-2 y PMWaV-3 IJ1 ER-2, se encontró un porcentaje de identidad nucleotídica de 98,6 % y aminoacídica de 99,4 % (Tabla 7). En la comparación con las secuencias del gen *hsp70h* homólogas de aislados de PMWaV-3 de otras regiones, los porcentajes de identidad nucleotídica variaron entre 86,9 % y 99,4 %, y aminoacídica entre 94,6 % y 99,4 %. Los mayores valores de identidad nucleotídica y aminoacídica se verificaron con la secuencia del aislado de PMWaV-3 de Hawái (Tabla 7).

Por otra parte, la comparación entre las secuencias de los amplicones CP PMWaV-1 CA MD2-4 y LH ER-3, evidenció un porcentaje de identidad nucleotídica de 99,9 % y aminoacídica de 99,6 % (Tabla 8). En la comparación con las secuencias del gen *cp* de aislados de PMWaV-1 de otras regiones, los porcentajes de identidad nucleotídica variaron entre 98,1 % y 98,8 %, y aminoacídica entre 98,4 %-99,6 %. Los mayores valores, tanto de identidad nucleotídica como aminoacídica, se encontraron con las secuencias de este gen de los aislados de PMWaV-1 caracterizados en Hawái y Ecuador (Tabla 8).

Tabla 7. Identidad nucleotídica / identidad aminoacídica entre las secuencias del amplicón HSP70h de PMWaV-1, -2 y -3 caracterizados en este estudio (en negrita), y los caracterizados en otras regiones del mundo. Hawái-HW; Australia-AU; Tailandia-TL; Taiwán-TW; México-MX, Cuba: Ciego de Ávila, cv. 'MD-2'- CA MD2; La Habana, cv. 'Española roja'- LH ER; Isla de la Juventud, cv. 'Española roja'-IJ1 ER; Holguín, especie *B. pinguin* L.- HG BP. En rojo se señalaron los mayores valores de identidad de los aislados cubanos en comparación con los de otras regiones del mundo.

	Aislado[a]	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
PMWaV-1	1	**99,3/98,5**	99,2/98,0	99,3/98,5	99,5/99,5	99,0/97,4	98,6/99,0	96,8/98,5	96,3/98,5	95,8/96,9	92,1/97,3	**100/100**	98,8/98,0
	2		98,5/95,9	98,6/96,4	98,8/97,4	98,3/95,4	98,0/96,9	96,1/96,4	95,6/96,4	95,1/94,9	91,4/95,2	**99,3/97,9**	98,1/95,9
	3			99,2/98,5	99,0/98,5	98,5/96,4	98,1/98,0	96,4/97,4	95,9/97,4	95,4/95,9	91,4/95,2	99,1/97,9	98,3/96,9
	4				99,2/99,0	98,6/96,9	98,3/98,5	96,4/98,0	96,3/98,0	95,4/96,4	91,4/95,8	99,3/98,4	98,5/97,4
	5					98,8/98,4	98,6/99,5	96,6/99,0	96,1/99,0	95,9/97,4	91,6/96,8	99,5/99,5	98,6/98,5
	6						98,1/99,5	96,1/96,9	95,6/96,4	95,1/95,4	91,2/94,7	98,9/97,3	98,1/96,4
	7							96,1/99,0	95,6/99,0	94,7/97,4	91,0/96,8	98,6/98,9	97,8/98,0
	8								99,5/100	98,6/98,5	91,6/96,8	96,7/98,4	95,9/97,4
	9									98,1/98,5	91,4/96,8	96,1/98,4	95,4/97,4
	10										90,5/95,7	95,6/96,8	94,9/95,9
	11											92,1/97,3	91,0/95,2
	12												98,8/97,9

[a] Aislados: (1) PMWaV-1 CA MD2-4, (2) PMWaV-1 LH ER-3, (3) PMWaV-1 TL PJ3, (4) PMWaV-1 TL 10, (5) PMWaV-1 TW PT1, (6) PMWaV-1 MX, (7) PMWaV-1 CH, (8) PMWaV-1 TL TK7, (9) PMWaV-1 TL CHP1-7Swe, (10) PMWaV-1 TL PB1-1Pbr, (11) PMWaV-1 AU pPMW313, (12) PMWaV-1 AU pF53pmw 10 y (13) PMWaV-1 HW.

	Aislado [a]	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PMWaV-2	1	**99,3/100**	**99,7/99,0**	**99,5/99,5**	**99,3/100**	99,3/100	99,3/100	99,5/100	**99,7/100**	99,0/98,0
	2		**99,0/99,0**	**98,9/99,5**	**99,3/100**	99,3/100	99,3/100	99,5/100	**99,7/100**	98,4/98,0
	3			**99,2/98,5**	99,0/99,0	99,0/99,0	99,0/99,0	99,2/99,0	**99,3/99,0**	98,7/97,0
	4				98,9/99,5	98,9/99,5	98,9/99,5	99,0/99,5	99,2/99,5	98,5/97,5
	5					99,7/100	99,7/100	99,8/100	99,7/100	98,4/98,0
	6						100/100	99,8/100	99,7/100	98,4/98,0
	7							99,8/100	99,7/100	98,4/98,0
	8								99,8/100	99,8/98,0
	9									98,7/98,0

[a] Aislados: (1) PMWaV-2 CA MD2-2, (2) PMWaV-2 IJ1 ER-2, (3) PMWaV-2 LH ER-1, (4) PMWaV-2 HG BP-3, (5) PMWaV-2 TL PJ3, (6) PMWaV-2 TL 10, (7) PMWaV-2 TL Pra2, (8) PMWaV-2 TL KB, (9) PMWaV-2 TW PT2 y (10) PMWaV-2 HW.

	Aislado[a]	2	3	4	5	6	7	8
PMWaV-3	1	**98,6/99,4**	97,6/100	97,6/98,8	87,5/94,5	87,9/95,8	97,5/98,1	**99,4/99,4**
	2		97,6/100	97,8/99,4	86,9/94,6	87,0/95,2	96,9/97,2	**98,4/98,8**
	3			99,0/99,4	86,8/94,6	87,0/95,2	95,4/97,2	97,6/98,8
	4				87,0/94,0	87,2/96,4	95,0/97,2	97,4/98,2
	5					97,6/97,0	87,9/90,6	86,8/93,4
	6						88,2/90,7	87,4/95,2
	7							97,2/96,3

[a] Aislados: (1) PMWaV-3 CA MD2-2, (2) PMWaV-3 IJ1 ER-2, (3) PMWaV-3 TW PJ3, (4) PMWaV-3 AU pB13P4P36, (5) PMWaV-3 AU pB13P4P37, (6) PMWaV-3 TL 10, (7) PMWaV-3 MX[b] y (8) PMWaV-3 HW. [b] Sólo se encontró en la base de datos del GenBank una secuencia de 324 nt y 108 aa de este aislado.

Los cuatro amplicones CP PMWaV-2 PMWaV-2 CA MD2-2, PMWaV-2 LH ER-1, PMWaV-2 IJ1 ER-2 y PMWaV-2 HG BP-3 mostraron valores de identidad nucleotídica y aminoacídica que variaron entre 99 % - 99,6 %, y 97,7 % - 99 %, respectivamente (Tabla 8). En la comparación con secuencias del gen *cp* de aislados de PMWaV-2 de otras regiones, los valores de conservación nucleotídica estuvieron entre 98,5 % y 99,6 %, y aminoacídica 98,0 % y 99,7 %. En esta comparación se obtuvieron los mayores valores de identidad, nucleotídica y aminoacídica, con las secuencias del aislado PMWaV-2 CU CA CL (Tabla 8), el cual fue caracterizado previamente en plantas de 'Cayena lisa' de Ciego de Ávila, Cuba (Borroto *et al*., 2007).

La comparación entre las secuencias de los amplicones CP PMWaV-3 CA MD2-2 y PMWaV-3 IJ1 ER-2, mostró identidad nucleotídica y aminoacídica de 98,5 % (Tabla 8). Únicamente se encontraron disponibles en las bases de datos secuencias de este gen de los aislados de PMWaV-3 de Hawái y Taiwán (PMWaV-3 TW TP3), con los cuales se obtuvieron valores de

conservación nucletídica de 97,3 % y 98,1 %, y aminoacídica 97 % y 99,6 %, respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Identidad nucleotídica / identidad aminoacídica entre las secuencias del amplicón CP de los aislados cubanos de PMWaV-1, -2 y -3 (en negrita), y los caracterizados en otras regiones del mundo. Hawái-HW; Australia-AU; Tailandia-TL; Taiwán-TW; Ecuador-EC, Cuba: Ciego de Ávila, cultivar 'MD-2'- CA MD2; La Habana, cv. 'Española roja'- LH ER; Isla de la Juventud, cv. 'Española roja'-IJ1 ER; Holguín, especie *B. pinguin* L.- HG BP; Ciego de Ávila, cv. 'Cayena lisa'- CU CA CL Ciego de Ávila, cv. 'Cayena lisa'- CU CA CL (Borroto *et al*., 2007). En rojo se señalaron los mayores valores de identidad de los aislados cubanos en comparación con los de otras regiones del mundo.

PMWaV-1						
Aislado[a]	2	3	4	5	6	7
1	**99,9/99,6**	98,8/99,2	98,7/98,8	**98,8/99,6**	98,2/98,8	98,8/**99,6**
2		98,7/98,8	98,6/98,4	**98,7/99,2**	98,1/98,4	**98,7/99,2**
3			99,0/98,1	99,2/99,6	98,4/98,1	99,2/99,6
4				99,0/98,4	98,4/97,7	99,0/98,4
5					98,4/98,4	99,2/100
6						98,4/98,4

[a] Aislados: (1) PMWaV-1 CA MD2-4, (2) PMWaV-1 LH ER-3, (3) PMWaV-1 CH, (4) PMWaV-1 TW PT1, (5) PMWaV-1 EC, (6) PMWaV-1 TL PT48-1 y (7) PMWaV-1 HW.

PMWaV-2						
Aislado[a]	2	3	4	5	6	7
1	**99,2/98,3**	**99,0/97,7**	**99,2/98,0**	**99,4/98,7**	98,6/98,0	98,9/98,0
2		**99,3/99,3**	**99,6/99,0**	**99,6/99,7**	98,9/**99,0**	**99,2/99,0**
3			**99,1/98,3**	**99,3/99,0**	98,5/98,3	98,8/98,3
4				**99,6/99,3**	98,9/98,7	99,2/98,7
5					99,1/99,3	99,4/99,3
6						99,0/99,3

[a] (1) PMWaV-2 CA MD2-2, (2) PMWaV-2 IJ1 ER-2, (3) PMWaV-2 LH ER-1, (4) PMWaV-2 HG BP-3, (5) PMWaV-2 CU CA CL, (6) PMWaV-2 TW PT2 y (7) PMWaV-2 HW.

PMWaV-3			
Aislado[a]	2	3	4
1	**98,5/98,5**	97,6/97,0	**98,1/98,1**
2		97,3/97,7	**98,1/99,6**
3			99,1/98,1

[a] (1) PMWaV-3 CA MD2-2, (2) PMWaV-3 IJ1 ER-2, (3) PMWaV-3 TW TP3 y (4) PMWaV-3 HW.

Los porcentajes de identidad nucleotídica y aminoacídica de los amplicones HSP70h y CP de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 caracterizados en este estudio, con respecto a las secuencias de los aislados de las mismas especies de PMWaV, fueron superiores al 86,9 % (Tabla 7 y Tabla 8). El criterio de demarcación en la familia *Closteroviridae* establece porcentajes de identidades aminoacídicas superiores al 75 % de las proteínas RdRp, HSP70h o CP para la identificación de aislados de una especie (Martelli *et al*., 2012a). Tomando esto en consideración, los valores de identidad determinaron que cada amplicón fuera nombrado como un aislado cubano de la especie de PMWaV con la que se comparó.

La variación entre las secuencias nucleotídicas de los amplicones HSP70h de PMWaV-3 (86,8 % - 99,4 %) fue más amplia que las observadas para las de PMWaV-1 (90,5 % - 100 %) y PMWaV-2 (98,4 % - 100 %) (Tabla 8). Esto se correspondió con un rango de variación de la identidad aminoacídica más amplio para el producto HSP70h de PMWaV-3 (90,6 % - 100 %), que PMWaV-1 (95,7 % - 100 %) y PMWaV-2 (97,0 % - 100 %). La comparación para el gen *cp* fue diferente, con amplitudes en los rangos de variación similares entre las tres especies, 98,1 % - 99,4 %, para PMWaV-1, 98,5 % - 99,6 %, para PMWaV-2 y 97,3 % - 98,5 %, PMWaV-3. Por su parte, la conservación aminoacídica para este gen estuvo entre 97,7 % - 99,6 % para PMWaV-1, 98,0 % - 99,7 % para PMWaV-2, y 97,7 % - 99,6 % para PMWaV-3.

Para investigar la influencia de las variaciones en los rangos de conservación nucleotídica en las relaciones filogenéticas entre los aislados de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3, y miembros de otros géneros de la familia *Closteroviridae*, los alineamientos de las secuencias

obtenidas se utilizaron para la reconstrucción de dos árboles, uno para cada gen analizado. En los dos árboles filogenéticos reconstruidos a partir de las secuencias de los amplicones HSP70h y CP, formaron tres ramas primarias que agruparon a cada una a los miembros de los géneros *Closterovirus*, *Crinivirus* y *Ampelovirus*, (*Closteroviridae*) (Figura 13 y Figura 14).

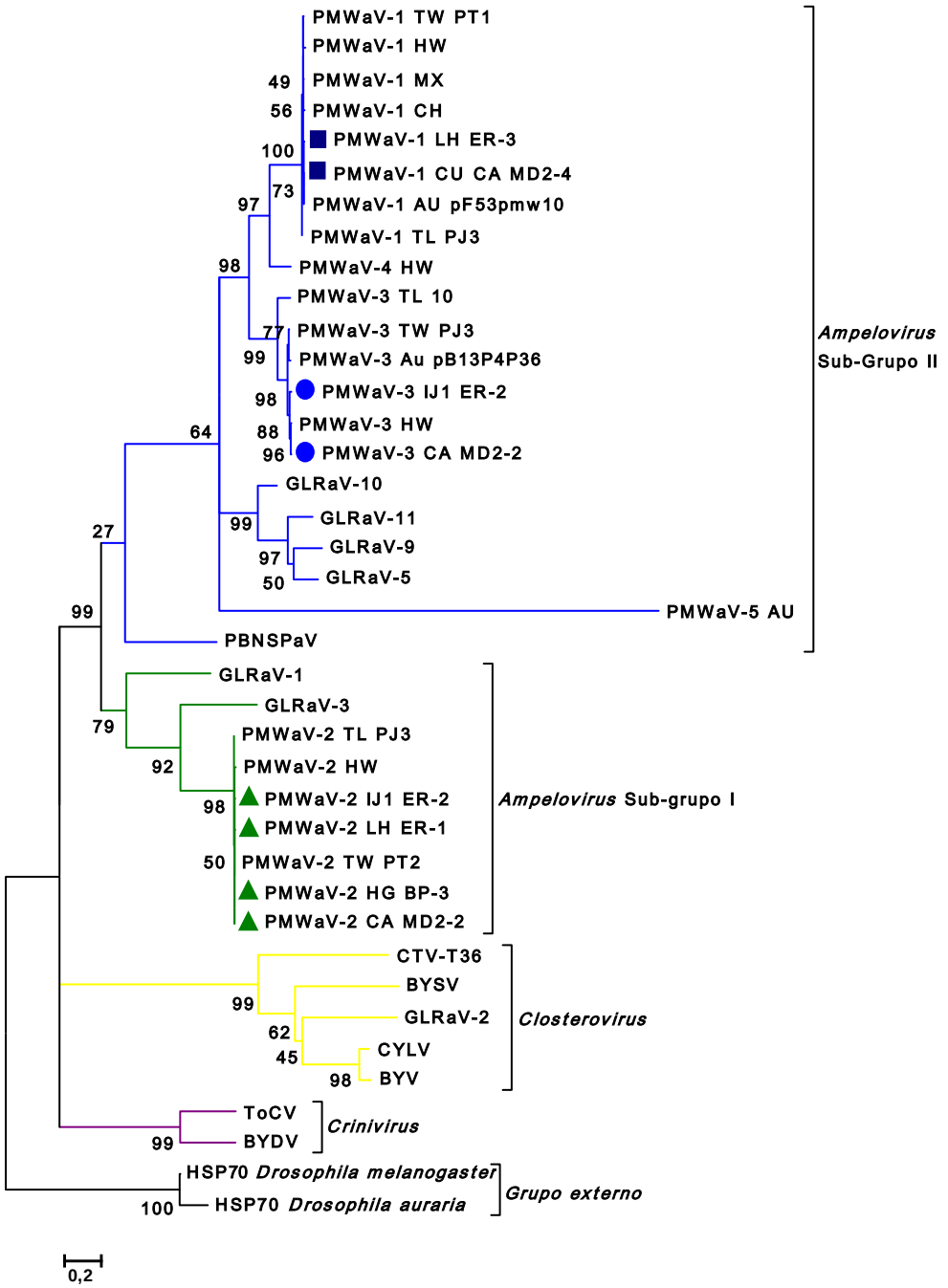


Figura 13. Árbol filogenético reconstruido a partir de la comparación de la secuencia de 349 nt del amplicón HSP70h de los aislados cubanos de PMWaV-1 (señalados con ■), PMWaV-2 (▲) y PMWaV-3 (●), caracterizados en este estudio, con fragmentos homólogos de otros aislados de la misma especie, otros ampelovirus y miembros de la familia *Closteroviridae*. Clasificación de los virus según Martelli *et al*. (2012). El árbol se construyó mediante el método de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo Tamura 3-parameter (T92) con distribución Gamma (+G) asumiendo una fracción de sitios como invariables evolutivamente (+I) y 1000 repeticiones de remuestreo.

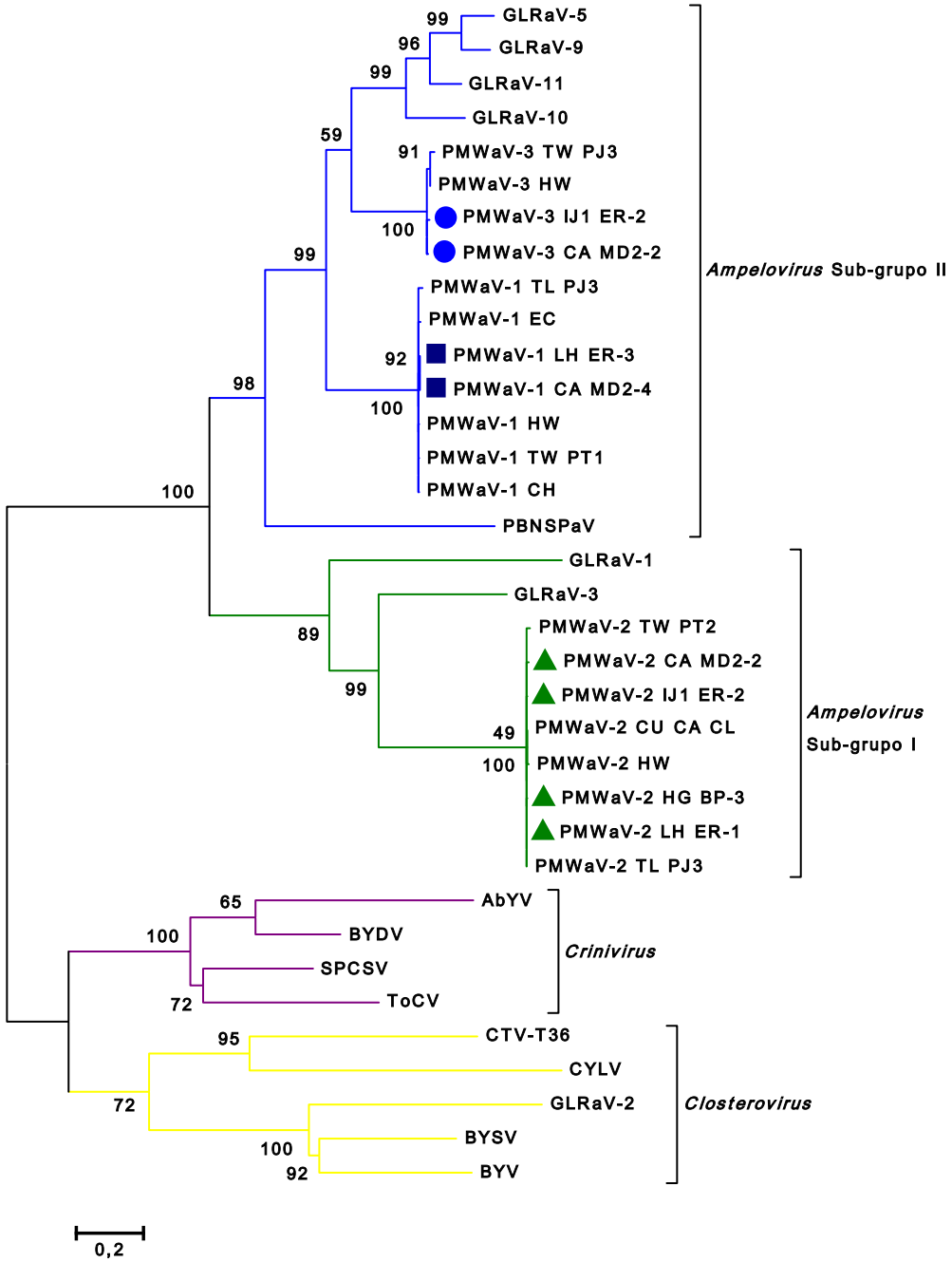


Figura 14. Árbol filogenético reconstruido a partir de la comparación del amplicón CP de los aislados cubanos de PMWaV-1 (señalados con ■), PMWaV-2 (▲) y PMWaV-3 (●), caracterizados en este estudio, con el gen homólogo de otros aislados de la misma especie, otros ampelovirus y miembros de la familia *Closteroviridae*. Clasificación de los virus según Martelli *et al*. (2012). El árbol se construyó mediante el método de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo Tamura 3-parameter (T92) con distribución Gamma (+G) asumiendo una fracción de sitios como invariables evolutivamente (+I) y 1000 repeticiones de remuestreo.

Los ocho aislados en caracterización PMWaV-1 (CA MD2-4 y LH ER-3), PMWaV-2 (CA MD2-2, LH ER-1, IJ1 ER-2, HG BP-3) y PMWaV-3 (CA MD2-2 y IJ1 ER-2), se agruparon la rama primaria de los ampelovirus, con una probabilidad de formación del 100 %.

A su vez, la rama de los ampelovirus se sub-dividió en dos ramas secundarias, con una probabilidad de 99 % con el árbol del gen *hsp*70h (Figura 13) y de 100 % con el gen *cp*

(Figura 14). Estas ramas secundarias de los ampelovirus reunieron a los miembros del Sub-grupo I (aislados de PMWaV-2, GLRaV-3 y otros GLRaV), y el Sub-grupo II (aislados de PMWaV-1, PMWaV-3, PMWaV-4 y PMWaV-5, PBNSPaV y otras especies de GLRaV).

El árbol generado a partir del fragmento HSP70h evidenció la relación más cercana entre el aislado de Australia de PMWaV-1 AU pF53pmw10 y los cubanos PMWaV-1 CA MD2-4, PMWaV-1 LH ER-3 (Figura 13). A su vez, los aislados cubanos de PMWaV-2 (PMWaV-2 CA MD2-2, PMWaV-2 LH ER-1, PMWaV-2 IJ1 ER-2 y PMWaV-2 HG BP-3) se situaron con una menor distancia en el árbol de los aislados de PMWaV-2 de Taiwán (PMWaV-2 PT2) y de Hawái. Asimismo, los aislados de PMWaV-3 en caracterización (PMWaV-3 CA MD2-2 y PMWaV-3 IJ1 ER-2) fueron más similares filogenéticamente al aislado de Hawái.

El análisis de la rama secundaria del Sub-grupo II de los ampelovirus en el árbol reconstruido con el gen *cp* mostró la cercanía de los aislados PMWaV-1 CA MD2-4 y PMWaV-1 LH ER-3, con las secuencias de los aislados de Ecuador y Hawái (Figura 14). Sin embargo, no se encontró la secuencia del aislado de Australia (PMWaV-1 AU pF53pmw10), el cual en la comparación del fragmento HSP70h fue el más cercano a los aislados cubanos de PMWaV-1.

En esta misma sub-rama del Sub-grupo II de los ampelovirus, las secuencias del gen *cp* de los aislados de PMWaV-3 (PMWaV-3 CA MD2-2 y PMWaV-3 IJ1 ER-2), de igual forma que en el árbol con el fragmento HSP70h, se agruparon más cercanamente con el aislado de esta especie viral de Hawái.

La sub-rama secundaria del árbol con el gen *cp* evidenció la amplia relación de los aislados cubanos de esta especie viral (PMWaV-2 CA MD2-2, PMWaV-2 LH ER-1, PMWaV-2 IJ1 ER-2 y PMWaV-2 HG BP-3) con los correspondientes de Taiwán (PMWaV-2 TW PT2) y Hawái (99 % de probabilidad de formación) (Figura 14).

Se debe notar que la relación más cercana de las secuencias en caracterización durante este estudio fue con PMWaV-2 CU CA CL, aislado cubano caracterizado por Borroto *et al*. (2007).
En esta misma sub-rama del Sub-grupo II de los ampelovirus, las secuencias del gen *cp* de los aislados de PMWaV-3 (PMWaV-3 CA MD2-2 y PMWaV-3 IJ1 ER-2), de igual forma que en el árbol con el fragmento HSP70h, se agruparon más cercanamente con el aislado de esta especie viral de Hawái.

La sub-rama secundaria del árbol con el gen *cp* evidenció la amplia relación de los aislados cubanos de esta especie viral (PMWaV-2 CA MD2-2, PMWaV-2 LH ER-1, PMWaV-2 IJ1 ER-2 y PMWaV-2 HG BP-3) con los correspondientes de Taiwán (PMWaV-2 TW PT2) y Hawái (99 % de probabilidad de formación) (Figura 14). Sin embargo, se debe notar que la relación más cercana de las secuencias en caracterización durante este estudio fue con PMWaV-2 CU CA CL, aislado cubano caracterizado por Borroto *et al*. (2007).

La caracterización mediante RFLP *in vitro* de los amplicones HSP70h y CP de PMWaV-1 y PMWaV-2, mostró patrones de restricción similares a los obtenidos en el análisis *in silico* de las secuencias de aislados de estas especies de otras regiones del mundo. Este resultado apoyó las evidencias del diagnóstico positivo en la detección de estas especies virales mediante los ensayos de RT-PCR. Sin embargo, si bien el análisis de RFLP de los amplicones HSP70h de PMWaV-3 mostró coincidencia con el de los aislados de otras regiones, se detectó polimorfismo en los amplicones CP que pudiera indicar una variabilidad genética en las secuencias de este gen.

Las secuencias de los amplicones HSP70h y CP obtenidos a partir de ocho aislados recuperados de plantas de piña colectadas durante las prospecciones (dos de PMWaV-1,

cuatro de PMWaV-2 y dos de PMWaV-3) mostraron valores de identidad nucleotídica superiores al 97 %, con respecto a los fragmentos homólogos de otras regiones del mundo. Según el criterio de demarcación en la familia *Closteroviridae*, valores superiores al 75 % de identidad nucleotídica en la comparación de los ORFs de la HSP70h, la CP o la RdRp, identifican un aislado en análisis como cepa de un ampelovirus previamente asignado (Martelli *et al*., 2012a). Los valores de identidades nucleotídicas indicaron definitivamente la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en las plantas diagnosticadas.

Estos resultados permitieron realizar los primeros informes de PMWaV-1 y PMWaV-3 en plantaciones comerciales de piña en Cuba y en la Cuenca del Caribe, así como la presencia de PMWaV-2 en otras áreas del país alejadas de Ciego de Ávila (Isla de la Juventud y La Habana), y en otros cultivares de piña ('Española roja' y 'MD-2'). Con anterioridad a esta investigación, sólo se había informado en Cuba la presencia de partículas virales similares a la de los closterovirus, y posteriormente la presencia de PMWaV-2 en tres plantas de piña cv. 'Cayena lisa' de la estación experimental “Tomás Roig”, Ciego de Ávila (Borroto *et al*., 1998, 2007).

Un resultado interesante fueron los altos valores de identidad nucleotídica (mayores que 99,3 %), obtenidos en la comparación entre los aislados en caracterización, con la secuencia del aislado de PMWaV-2 caracterizado por Borroto *et al*. (2007) en plantas de 'Cayena lisa' de Ciego de Ávila. Esta alta identidad llama la atención, tomando en cuenta el periodo de tiempo transcurrido entre las colectas del aislado caracterizado por Borroto *et al*. (2007), y los de este estudio (2009-10).

Los aislados caracterizados durante esta investigación se colectaron en zonas geográficas alejadas de Ciego de Ávila (Isla de la Juventud, La Habana y Holguín) y en diferentes cultivares ('Española roja' y 'MD-2') o especies (*B. pinguin*). Estos factores (tiempo entre colecta, separación geográfica y diferencias entre hospedantes) se han descrito como presiones evolutivas adaptativas que generan altas tasas de cambios en los genomas de otros ampelovirus (Maliogka *et al*., 2008; Hull, 2009).

La alta conservación en la secuencia del amplicón CP obtenida entre los aislados de PMWaV-2 caracterizados durante esta investigación pudiera indicar que existen restricciones a los cambios nucleotídicos en su secuencia. Contradictoriamente, en los closterovirus, el largo de sus genomas y sus variados mecanismos para la expresión génica, potencian la ocurrencia de rearreglos de su genoma, adquisición de otros modulos por recombinación y otros cambios ya sean micro o macroevolutivos (Hull, 2009; Harper *et al*., 2015). No obstante, se requieren estudios más amplios para la obtención de secuencias que apoyen esta hipótesis.

Las secuencias de los amplicones HSP70h y CP de PMWaV-2, aisladas en plantas de piña ratón, mostraron identidades nucleotídicas superiores al 98 % con todas las secuencias disponibles de PMWaV-2. Este resultado constituyó la confirmación de la infección de las plantas de piña ratón con esta especie viral, y el hallazgo de un nuevo hospedante natural para este virus. En estudios previos a este trabajo, otras especies de bromeliáceas como *A. ananassoides, A. erectifolius, A. bracteatus* y *A. bracteatus var. Tricolor*, resultaron ser hospedantes de varios de los virus del grupo de ampelovirus encontrados en *A. comosus* (Sether *et al*., 2005b).

Este hecho tiene una importancia epidemiológica particular para Cuba, debido al uso extensivo de la piña ratón como cerca viva en las poblaciones rurales desde hace más de un siglo (Crane, 1945). Las cercas de piña ratón próximas a las plantaciones comerciales de piña

pueden constituir tanto hospedantes alternativos de las cochinillas como del complejo los virus para nuevas plantaciones. Las cochinillas no se desplazan largas distancias, sin embargo las hormigas incrementan su movilidad hasta distancias de 125 metros en un mes, lo que apoya la significación epidemiológica de este resultado (Rouffiange, 1993).

La comparación entre las identidades nucleotídicas y los árboles filogenéticos reconstruidos a partir de los análisis de las secuencias de los amplicones HSP70h y CP de los ocho aislados cubanos y los de otras regiones del mundo, mostraron una alta relación entre ellos. Los aislados de PMWaV-1 de Cuba mostraron la mayor relación filogenética con el aislado de Australia, mientras que los aislados de PMWaV-2 y PMWaV-3 fueron más similares a los aislados de Hawái y Taiwán. Los resultados indicaron una baja variabilidad genética, lo que se evidenció en las comparaciones entre las secuencias de aminoácidos derivadas de la traducción de las secuencias nucleotídicas determinadas en este estudio.

A pesar de los altos porcentajes de identidad nucleotídica, se detectaron algunas mutaciones en las secuencias amplificadas. Así por ejemplo, el valor de 98 % de identidad nucleotídica obtenido en la comparación del fragmento de 500 pb del aislado PMWaV-3 IJ1 ER-2 (aislado de PMWaV-3 de la isla de la Juventud), se correspondió con cambios en ocho bases respecto a la secuencia con la que este aislado mostró la mayor relación PMWaV-3 HW (PMWaV-3 aislado de Hawái). Por otro lado, el valor de 99 % obtenido para PMWaV-2 LH ER-1 (aislado de PMWaV-2 de La Habana), representó el cambio de tres bases en un fragmento de 610 pb, respecto al aislado de relación PMWaV-3 TW (PMWaV-3 aislado de Taiwán). Sin embargo, luego de la traducción *in silico* de las secuencias nucleotídicas, los cambios detectados resultaron ser silentes.

Los valores de similitud aminoacídica de las secuencias deducidas a partir de las lecturas nucleotídicas de los dos genes estudiados fueron mayores a los porcentajes de identidad nucleotídica, lo que sugirió que varios cambios nucleotídicos resultaron en mutaciones silentes. Las mayores identidades nucleotídicas se registraron en las comparaciones entre las secuencias de los aislados cubanos. La baja variabilidad de la secuencia de aminoácidos en los fragmentos estudiados está relacionada con el alto grado de conservación de los ORFs de la proteína de shock térmico y la proteína de cápside en la familia *Closteroviridae* (Dolja *et al*., 2006; Sether *et al*., 2009). En general estos resultados evidenciaron la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en muestras de varias provincias de Cuba. Sin embargo, el complejo viral asociado a la enfermedad MWP también esta integrado por miembros del género *Badnavirus*, de la familia *Caulimoviridae*. Su prospección se describe a continuación.

V.2.3 Caracterización de badnavirus en las áreas de piña visitadas

Con el objetivo de investigar la presencia de badnavirus en plantas de piña de Cuba, se seleccionaron muestras de las plantas colectadas durante las prospecciones (Tabla 2) para diagnosticar la presencia de miembros de este género viral (Tabla 9). El criterio de selección de estas plantas fue: (1) presencia de los síntomas característicos de la enfermedad MWP y de cochinillas, vectores potenciales de los badnavirus, (2) origen en regiones geográficas distantes unas de otras y (3) plantas de las especies de *A. ananassoides* y *B. pinguin* (posibles hospedantes alternativos).

La extracción del ADN total se realizó con el método de CTAB (cetil trimetil bromuro de amonio) de Murray y Thompson (1980) a partir de 500 mg del tejido etiolado de la base de las hojas [recomendado por Dey *et al*. (2012)], y se maceró con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. Se agregó 3 mL de tampón de extracción (Tris HCl 100 mM pH 8; EDTA 20 mM

pH 3; NaCl 1,4 M; PVP10 1 % y CTAB 2 %) y se incubó a 65 °C durante 30 min. La mezcla se centrifugó durante 20 min a 4 °C y se extrajo el sobrenadante, al que se añadió 1 V de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó durante 10 min a 4 °C y se adicionó 1/10 V de acetato de sodio 3M y 2 V de etanol absoluto a la fase acuosa. El ADNt se precipitó mediante centrifugación durante 10 min a 4 °C.

Tabla 9. Plantas seleccionadas para la evaluación del método PCR-Badnavirus y la caracterización de aislados de Cuba

Origen	Finca (código)	Hospedante	Colecta	Plantas
Pinar del Río	Los Palacios, PR2	*B. pinguin*	10/2011	PR2 BP-1 a -4
La Habana	Habana del este, LH	*A. ananassoides*	01/2010	LH AA-1 y -2
La Habana	Habana del Este, LH	'Española roja'	01/2010	LH ER-4 y -5
Matanzas	Los Arabos, MT1	'Española roja'	01/2010	MT1 ER-2 y -3
Ciego de Ávila	La piña, CA	*B. pinguin*	01/2012	CA BP-1 a -4
Ciego de Ávila	La piña, CA	*A. ananassoides*	01/2012	CA AA-1 y -2
Granma	Campechuela, GR	'Española roja'	08/2010	GR ER-1 a -4
Holguín	Banes, HG	*B. pinguin*	08/2010	HG BP-1 a -4
Guantánamo	Niceto Perez, GN1	'Española roja'	02/2010	GN1 ER-1 a -4

El precipitado se conservó en 1 mL de etanol a -20 °C hasta el momento de su utilización en los análisis de diagnóstico. En el momento del diagnóstico, se centrifugó durante 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó durante 15 min. Los precipitados se resuspendieron en 100 µL de agua doble destilada (H_2Odd). La integridad del ADN extraído se comprobó por electroforesis de 1 µL del extracto, en un gel de agarosa al 0,8 % (p/v) con tinción con bromuro de etidio a 0,5 mg/mL, según Sambrook *et al*. (1989). Los geles se corrieron en tampón TAE 1X a 100 V/7,5 mA, durante 15 min.

La detección genérica de badnavirus (PCR-Badnavirus) para identificar miembros de este género en las plantas muestreadas, se realizó mediante reacciones de PCR con los cebadores degenerados Badna-1A y Badna 4 (Tabla 10) (Geering *et al*., 2005a). Estos cebadores dirigen la amplificación de un fragmento de ADN de la región reverso transcriptasa/RNAsaH (amplicón RT/RNasaH) del ORF3 de forma genérica de los caulimovirus.

Tabla 10. Cebadores degenerados utilizados en la detección de badnavirus (Geering *et al*., 2005a).

Virus	Cebador: secuencia 5'-3'	Sitios de hibridación en el genoma (5'-3')[a]
Badnavirus	**Badna 1A**: CTNTAYGARTGGYTNGTNATGCCNTTYGG **Badna 4** : TCCAYTTRCANAYNSCNCCCCANCC	5 695 nt -6 235 nt

[a] Región aproximada de hibridación en el genoma de PBCOV-H11 Hw aislado en Hawái (Anexo 3).

Las reacciones de PCR se realizaron con el sistema *PCR Master* (Roche), siguiendo las concentraciones de reactivos y condiciones recomendadas por el fabricante. El programa de PCR constó de 2 min de desnaturalización a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg de hibridación de los cebadores a 52 °C, y 1 min de polimerización a 72 °C, y posterior

extensión de 5 min a 72 °C, de acuerdo con Geering *et al*. (2005ª). Como controles negativos del ensayo se utilizaron extractos de ADN de una planta de piña cv. 'MD-2', obtenida mediante el cultivo *in vitro* de meristemos, gentilmente donada por el Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila, y como blanco experimental H_2Odd.

El procesamiento por la PCR-Badnavirus de 12 muestras de colectadas en Granma [GR ER-1 a -4]; La Habana [LH ER-3 y -4]; Guantánamo [GN1 ER-1 a -2] y Matanzas [MT1 ER-2 y -3], mostró la amplificación de una banda con una talla aproximada de 600 pb en ocho de ellas (amplicón RT/RNasaH) (Figura 15, carriles 1-5). En la reacción utilizando el blanco experimental (H_2Odd), no se obtuvo banda alguna (Figura 15, carril 6). Sin embargo, con el ADN de la planta del cv. 'MD-2', obtenida mediante el cultivo *in vitro* de meristemos, se observó una banda con la talla similar a la descrita anteriormente (Figura 15, carril 5).

La talla de los amplicones obtenidos coincidió con la esperada según los cebadores Badna-1a/Badna 4, los que amplifican un fragmento de entre 546 pb-572 pb de la región RT/RNasaH de los caulimovirus (Geering *et al*., 2005a). El análisis para la identificación de badnavirus en las áreas prospectadas mostró su presencia en las plantas del cv. 'Española roja' de las cuatro provincias de donde procedieron las plantas seleccionadas (Tabla 11). No se obtuvo amplificación alguna en ninguna de las muestras colectadas en las plantas de piña ratón (*B. pinguin*) y de jardín (*A. ananassoides*) examinadas para la presencia de ampelovirus.

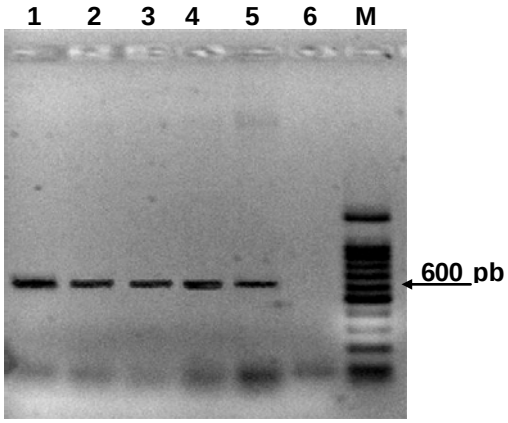


Figura 15. Productos amplificados en la PCR-Badnavirus a partir de de plantas de piña cv. 'Española roja' colectadas en: **1**-Campechuela, Granma (GR ER-1); **2**-Habana del Este, La Habana (LH ER-4); **3**-Niceto Pérez, Guantánamo (GN1 ER-2), **4**-Los Arabos, Matanzas (MT1 ER-2), **5**-extracto de piña de planta obtenido a partir de cultivo *in vitro* de meristemos (CA MD2-15) y **6**-blanco experimental (H_2Odd). **M**- y escalera 100pb (Promega).

A partir de los productos obtenidos en la PCR-Badnavirus, se seleccionaron cuatro amplicones caracterizados molecularmente para su uso como controles positivos, que se nombraron como BGR ER-1 [planta hospedante GR ER-1], BLH ER-4 [LH ER-4], BGN1 ER-2 [GN1 ER-2] y BMT1 ER-2 [MT1 ER-2] (Tabla 11). Asimismo, para investigar si el resultado positivo obtenido a partir del extracto de la planta CA MD2-15, utilizada como control negativo del ensayo (obtenida a paritr del cultivo *in vitro* de meristemos), se debía a una inespecificidad de la PCR-Badnavirus, también se seleccionó el amplicón obtenido a partir de esta planta (BCA MD2-15) para determinar su identidad (Tabla 11).

V.2.3.1.1 Análisis de las secuencias de los amplicones RT/RNasaH

La caracterización molecular de aislados se realizó a partir de una selección de los amplicones RT/RNasaH obtenidos a partir de las plantas seleccionadas anteriormente (Tabla 9). La selección de los aislados a partir del conjunto de plantas analizadas, se realizó tomando en cuenta que: (1) fueran plantas las tres regiones geográficas de Cuba, (2) que la talla del amplicones obtenido en la reacción de PCR-Badnavirus fuera la esperada y (3) obtenidos a partir de plantas de las especies de *A. ananassoides* y *B. pinguin* (posibles hospedantes alternativos). Los amplicones seleccionados para su caracterización a partir de estas plantas

se identificaron con una letra B, seguido del acrónimo de la planta muestreada, de forma similar a lo descrito para los ampelovirus (epígrafe V.2.2.2).

Tabla 11. Resultados de la PCR-Badnavirus en las plantas seleccionadas. PR2: Pinar del Río, Los Palacios, finca 2; LH: La Habana, Habana del Este; MT1: Matanzas, Los Arabos; CA: Ciego de Ávila; GR: Granma, Campechuela; HG: Holguín, Banes; GN1, Guantánamo, Niceto Pérez, finca 1; ER: 'Española roja', BP: *B. pinguin*, AA: *A. ananassoides*.

Planta	PCR-Badnavirus[a]	Amplicón seleccionado
PR2 BP-1	-	-
PR2 BP-2	-	-
PR2 BP-3	-	-
PR2 BP-4	-	-
LH ER-4	+	BLH ER-4
LH ER-5	-	-
LH AA-1	-	-
LH AA-2	-	-
LH ER-4	-	-
LH ER-5	-	-
MT1 ER-2	+	BMT1 ER-2
MT1 ER-3	-	-
CA BP-1	-	-
CA BP-2	-	-
CA BP-3	-	-
CA BP-4	-	-
CA AA-1	-	-
CA AA-2	-	-
GR ER-1	+	BGR ER-1
GR ER-2	+	-
GR ER-3	+	-
GR ER-4	-	-
HG BP-1	-	-
HG BP-2	-	-
HG BP-3	-	-
HG BP-4	-	-
GN1 ER-1	+	-
GN1 ER-2	+	BGN1 ER-2
GN1 ER-3	-	-
GN1 ER-4	+	-

[a] + y -: resultado positivo y negativo en el diagnóstico mediante PCR-Badnavirus.

Los productos obtenidos en las reacciones de PCR-Badnavirus (amplicones RT/RNasaH) se clonaron en el plasmidio pGEM®-T Easy Vector (Promega) (Anexo 1), siguiendo un procedimiento similar al empleado para este fin en la caracterización molecular de los amplicones de los ampelovirus (epígrafe V.2.2.2). La identidad de los amplicones obtenidos se determinó mediante la obtención de las secuencias de cuatro clones de cada fragmento RT/RNasaH, obtenido a partir de cada una de las plantas seleccionadas para la caracterización. Los clones para secuenciar se seleccionaron con patrones de RFLP idénticos entre sí.

La secuenciación y el procesamiento de las secuencias se realizaron siguiendo los procedimientos descritos para los amplicones de ampelovirus (epígrafe V.2.2.2). A partir de

este acápite, los amplicones RT/RNasaH se nombraron según el acrónimo del badnavirus con el cual se encontró la identidad nucleotídica requerida para la asignación de aislados a especies virales de la familia *Caulimoviridae* (Geering y Hull, 2012), seguido del código de la planta a partir de la cual se colectó el aislado. Las relaciones filogenéticas de los amplicones en caracterización con otros retroelementos se determinaron mediante la reconstrucción del árbol filogenético a partir del alineamiento con ClustalW de las secuencias obtenidas con el programa MEGA versión 6.06 (Tamura *et al*., 2013) (Anexo 3).

La reconstrucción de los árboles filogenéticos a partir de los alineamientos de las secuencias se realizó con el programa MEGA 6 (Tamura *et al*., 2013). El modelo de sustitución nucleotídica de mayor ajuste fue el GTR+G (General Time Reversible con distribución discreta Gamma [+G]). Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron con el método estadístico de Máxima Verosimilitud, con 1000 repeticiones de remuestreo. Como secuencias *out-groups* se utilizaron las de retrotranposones: Ty3/gypsy Monkey, Ty3/gypsy RIRE3 OS, Ty3/gypsy Ac_gypsy y Ty1/copia Tto1 (Anexo 3), según Bousalem *et al*. (2008) y Gambley *et al*. (2008b).

Se obtuvieron secuencias consenso de 540 nt de cada uno de los cinco amplicones seleccionados para la caracterización [BGR ER-1, BLH ER-4, BGN1 ER-2, BMT1 ER-2 y BCA MD2-15: JQ390618 al JQ390622] (Anexo 8). Las secuencias obtenidas se dividieron en dos grupos con diferentes características moleculares. El primer grupo se conformó por los amplicones RT/RNasaH obtenidos a partir de las plantas GR ER-1, LH ER-4, GN1 ER-2 y MT1 ER-2, con un rango de identidad nucleotídica y aminoacídica entre sí que varió entre 91,3 % - 96,7 %, y 98,3 % - 100 %, respectivamente (Tabla 12). La secuencia derivada del amplicón BCA MD2-15 difirió de las descritas anteriormente, y mostró porcentajes de identidad varió entre 50,6 % y 55,7 %.

Tabla 12. Identidad nucleotídica/aminoacídica de los amplicones RT/RNasaH obtenidos durante este estudio (señalados en negrita) con secuencias de badnavirus de otras regiones del mundo (los mayores valores se señalaron en rojo).**1-5**: BGR ER-1, BLH ER-4, BGN1 ER-2, BMT1 ER-2 y BCA MD2-15; **6**-PBCOV HW HI1, **7**- PBCOV AU1, **8**- PBCOV AU2, **9**- PBCOV CH1, **10**- PBCOV CH2, **11**- PBERV AU, **12**- ePBCOV HW y **13**- ePPRV-1 AU.

Aisla-do	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	**96,7/ 98,9**	**93,9/ 100**	**93,5/ 99,4**	**55,7/ 46,4**	81,8/ 95,0	81,9/ 94,4	81,3/ 94,4	81,5/ 94,4	81,5/ 94,4	46,6/ 12,0	56,9/ 48,0	56,6/ 47,8
2		**91,7/ 98,9**	**91,3/ 98,3**	**55,1/ 46,1**	81,1/ 93,9	81,9/ 93,3	81,9/ 93,3	81,1/ 93,3	81,1/ 93,3	46,6/ 12,6	56,5/ 48,0	56,7/ 47,5
3			**95,6/ 99,4**	**53,5/ 46,4**	81,1/ 95,0	81,9/ 94,4	81,7/ 94,4	81,9/ 94,4	81,9/ 94,4	47,0/ 12,0	54,1/ 47,8	54,5/ 48,0
4				**50,6/ 46,4**	81,9/ 94,4	82,2/ 93,9	80,7/ 93,9	**82,4/ 93,9**	**82,4/ 93,9**	47,2/ 12,0	56,9/ 47,8	55,4/ 47,8
5					55,9/ 44,9	54,6/ 44,9	54,9/ 44,7	54,9/ 44,4	54,8/ 44,4	44,4/ 9,8	**95,6/ 97,8**	94,8/ 97,2
6						97,2/ 99,4	83,1/ 95,5	96,7/ 98,3	96,7/ 98,3	45,1/ 12,8	56,5/ 45,8	54,4/ 48,8
7							83,1/ 96,1	97,6/ 98,9	97,6/ 98,9	45,5/ 12,9	55,0/ 45,5	54,3/ 45,5
8								82,8/ 96,1	82,8/ 96,1	46,5/ 10,9	55,2/ 46,1	55,6/ 46,1
9									100/ 100	46,2/ 13,0	56,1/ 46,1	53,4/ 45,8
10										46,2/ 12,9	56,1/ 45,8	53,4/ 45,8
11											44,5/ 10,4	45,3/ 9,2
12												94,6/ 94,7

Al comparar las secuencias obtenidas del primer grupo (GR ER-1, LH ER-4, GN1 ER-2 y MT1 ER-2), con las depositadas en las bases de datos internacionales, se encontraron porcentajes superiores al 80,1 % (identidad nucleotídica) y 93,3 % (identidad aminoacídica) con aislados de *Pineapple baciliform CO virus*, PBCOV (Tabla 12). Los mayores valores en esta comparación se correspondieron con las secuencias de PBCOV de China (Tabla 12). La secuencia de BCA MD2-15 mostró porcentajes de identidad nucleotídica y aminoacídica entre el 91,7 % y 95,6 % con las de endogenous Pineapple pararetrovirus-1 (ePPRV-1) de Australia y endogenous Pineapple baciliform CO virus ePBCOV-HI1 de Hawái.

El criterio de demarcación de especies dentro de la familia *Caulimoviridae* establece un 80 % de identidad nucleotídica como el límite para la identificación de aislados de una misma especie (Geering y Hull, 2012). Esta definición indicó que los amplicones RT/RNasaH BGR ER-1, BLH ER-4, BGN1 ER-2 y BMT1 ER-2 se corresponden con aislados de PBCOV de Cuba, y se denominaron: PBCOV GR ER-1, PBCOV LH ER-4, PBCOV GN1 ER-2 y PBCOV MT1 ER-2, siguiendo la misma metodología utilizada para la nomenclatura de los ampelovirus. El amplicón BCA MD2-15 se identificó como un aislado cubano de ePBCOV, y se nombró como ePBCOV CA MD2-15.

El análisis de las secuencias mostró un amplio polimorfismo en la comparación entre los amplicones obtenidos que pudieran tener un impacto en sus relaciones filogenéticas, por lo que se estudió la filogenia entre las secuencias comparadas y las de miembros de los géneros de la familia *Caulimoviridae.* Se construyó un árbol filogenético en el que se visualizaron las diferentes sub-ramas que agruparon a los miembros de los géneros de la familia *Caulimoviridae* (Figura 16). El árbol filogenético mostró la ubicación de las secuencias de PBCOV GR ER-1, PBCOV LH ER-4, PBCOV GN1 ER-2 y PBCOV MT1 ER-2 en el género *Badnavirus,* separados de los demás con una propabilidad de 76 % (Figura 16). En conjunto, los miembros del género *Badnavirus* se agruparon en dos sub-ramas principales con una probabilidad de división de 97% (Figura 16).

En una sub-rama se posicionaron los aislados de PBCOV caracterizados en este estudio, los encontrados en Hawái, China y Australia, PBERV, ComYMV, el miembro tipo del género *Badnavirus*, y otros badnavirus (SCBMV, BSV-CA, KTSV, CYMV y CyLNV) (Figura 16). La otra ramificación en la sub-rama de los badnavirus agrupó a PeVBV y DraBV. Los aislados cubanos de PBCOV se ubicaron con los aislados de PBCOV, separados de PBERV con una probabilidad de formación de esta agrupación del 92 %. Específicamente, PBCOV GR ER-1, PBCOV LH ER-4, PBCOV GN1 ER-2 y PBCOV MT1 ER-2 se agruparon en una sub-rama que los separó de los demás aislados de PBCOV con una probabilidad de 95 %, pero más cercanos al aislado de PBCOV de Hawái.

Por su lado, la secuencia del aislado ePBCOV CA MD2-15 se ubicó en una rama distinta, junto con los aislados de ePBCOV de Hawái y ePPRV-1 de Australia (Figura 16) y en un taxón intermedio entre las ramas de los géneros *Cavemovirus* y *Tungrovirus* de la familia *Caulimoviridae.* La secuencia de ePBCOV CA MD2-15 se relacionó más cercanamente con la similar caracterizada en Hawái, dividida de la de ePPRV-1 con probabilidad de formación de la sub-rama de 99 %.

La identidad nucleotídica de las secuencias de los amplicones obtenidos a partir de las plantas GR ER-1, LH ER-4, GN1 ER-2 y MT1 ER-2 fueron superiores al 80 % y las del control negativo (CA MD2-15), superior a 94,8 %, con las secuencias de PBCOV y ePBCOV ambos caracterizados en Hawái por Sether *et al*. (2012), respectivamente. Estas identidades fueron

suficientes para afirmar la infección por aislados cubanos de estos agentes virales (PBCOV y de ePBCOV), según el criterio de demarcación para especies en la familia *Caulimoviridae* (Geering y Hull, 2012).

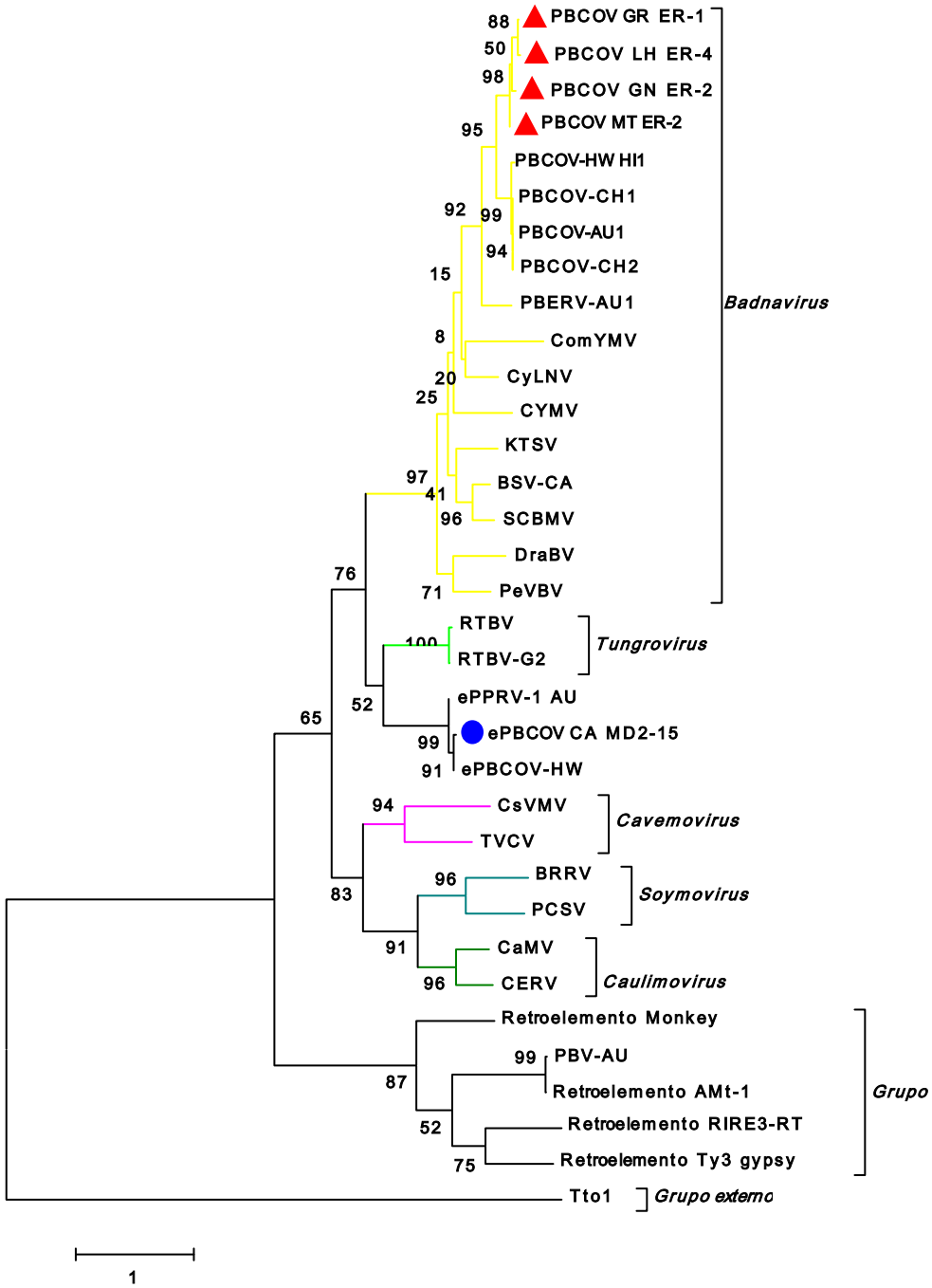


Figura 16. Árbol filogenético basado en la secuencia de 570 nt de los amplicones RT/RNAsaH de los aislados cubanos de PBCOV y ePBCOV, miembros de géneros de la familia *Caulimoviridae*, y como grupo externo secuencias de retroelementos depositadas en las bases de datos internacionales. El árbol se construyó mediante el método de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo General Time Reversible (GTR), con distribución Gamma (+G) y 1000 repeticiones de remuestreo. En el gráfico: señalados con ▲, aislados cubanos de PBCOV y con ●, secuencia cubana de ePBCOV.

La topología del árbol filogenético reconstruido con estas secuencias fue similar a los obtenidos en la caracterización de los aislados de Australia y Hawái (Gambley *et al*., 2008b; Sether *et al*., 2012). Este análisis mostró la relación más cercana de los aislados cubanos, tanto de PBCOV como de ePBCOV, con secuencias homólogas de aislados de Hawái.

Las identidades nucleotídicas entre las secuencias de PBCOV (-GR ER-1, -LH ER-4, -GN1 ER-2 y -MT1 ER-2) variaron entre 91,3 % y 96,7 %, lo que mostró la existencia de diversidad genética entre ellas. La mayor identidad que se encontró en el análisis de las secuencias de los cuatro aislados de PBCOV caracterizados en este estudio con aislados de otras regiones fue de sólo 82 %, entre PBCOV MT1 ER-2 (BMT1 ER-2) y PBCOV aislado en China. Un análisis similiar realizado con nueve aislados de PBCOV caracterizados en Hawái mostró identidades nucleotídicas que variaron en el rango de 81 % a 88 % en la misma región RT/RNasaH analizada en la caracterización de los cuatro aislados de PBCOV cubanos (Sether *et al*., 2012).

Se debe tener en cuenta, que solamente se recuperaron y compararon secuencias de 540 nt de la región RT/RNasaH, lo que representa el 7,2 % del genoma de PBCOV (7451 nt, PBCOV HW: GB398110). Aunque el fragmento Badna 1a/badna 4 del locus RT/RNasaH, es suficiente para la asignación de aislados a las diferentes especies en la familia *Caulimoviridae* (Geering y Hull, 2012), los bajos porcentajes de identidad nucleotídica encontrados y el tamaño de las secuencias analizadas, pudieran sugerir que los aislados de PBCOV de Cuba constituyen variantes nuevas de esta especie.

En un estudio de diversidad de aislados de *Cacao swollen shoot virus* (CSSV) en Ghana y Costa de Marfil, África, se encontró una extensa variabilidad entre los genomas de los aislados caracterizados, que no pudo ser detectada sólo con el análisis de la región RT/RNasaH (Chingandu *et al*., 2017). Esta investigación propuso que al menos para CSSV, es necesario la secuenciación del locus completo RT/RNasaH. Los resultados obtenidos de la caracterización de los cuatro aislados cubanos de PBCOV indican la necesidad de incrementar la cobertura de la secuenciación de sus genomas. Esto permitirá identificar la existencia de divergencia con los aislados de PBCOV de Hawái, China y Australia.

Los badnavirus son un grupo altamente diverso y heterogéneo de virus (Borah *et al*., 2013). Las variaciones entre las secuencias nucleotídicas de los diferentes aislados de BSV de Australia alcanzaron hasta el 33,6 % en la región RT/RNasaH (Geering *et al*., 2000). El análisis de 19 aislados de Dioscorea alata bacilliform virus (DaBV) y Dioscorea sansibarensis bacilliform virus (DsBV), infectando plantas de ñame (*Dioscorea* spp.), evidenció identidades nucleotídicas que variaron hasta el 25 % (Eni *et al*., 2008). Asimismo, el estudio de la región RT/RNasaH de 22 aislados de *Taro bacilliform virus* (TaBV), mostró variabilidades de hasta el 22,9 % y 13,6 % en los niveles nucleotídicos y aminoacídicos, respectivamente (Yang *et al*., 2003).

En otros badnavirus, contrariamente a lo antes expuesto, la heterogeneidad en sus secuencias no ha sido tan elevada. Las secuencias de los genomas completos de 19 aislados de *Citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV), de diferentes provincias de China, en comparación con las de cuatro aislados de Turquía y Paquistán, mostraron identidades nucleotídicas que variaron entre 97,1 % y 99,8 %. Esto indicó que al menos para este virus, existe una baja variación al nivel nucleotídico entre aislados colectados en diferentes regiones geográficas y hospedantes (Zhen *et al*., 2015; Zhou *et al*., 2017).

De acuerdo con la clasificación de los elementos endógenos en la familia *Caulimoviridae*, y siguiendo la metodología utilizada por Sether *et al*. (2012), la secuencia RT/RNasaH de la

planta CA MD2-15, se denominó como ePBCOV (ePBCOV CA MD2-15). La pérdida de homología entre las secuencias de ePBCOV CA MD2-15 y los cuatro aislados de PBCOV caracterizados durante esta investigación (identidad nucleotídica: 50,6 % - 55,7 % y aminoacídica: 46,1 % - 46,6 %), fue similar a los resultados obtenidos en Hawái entre PBCOV-HI1 y ePBCOV-HI1 y Australia entre PBCOV y ePPRV-1 (Gambley *et al*., 2008b; Sether *et al*., 2012).

Esto indicó que la secuencia de ePBCOV CA MD2-15 no se corresponde con una integración reciente del genoma de PBCOV en el ADN de la planta de piña del cv. 'MD-2' de Ciego de Ávila (CA-MD2-15). Sether *et al*. (2012) plantearon que estos elementos provienen de ancestros de badnavirus, perpetuados en el genoma de *Ananas* a través de la propagación vegetativa y que perdieron la capacidad de realizar infecciones *de novo*.

La extrema heterogeneidad entre varios badnavirus y las secuencias endógenas encontradas en sus hospedantes, (como PBCOV y ePBCOV), ha sugerido que los badnavirus tienen un origen antiguo, y se adaptó tempranamente a sus hospedantes. Las nuevas restricciones que sus nichos hospedantes han impuesto puede haber originado que sus genes ancestrales se hayan modificado o perdido, y se han adquirido nuevos genes, como un modo de adptación (Borah *et al*., 2013).

La distribución de estas secuencias esta relacionada con el intercambio de material propagativo de la piña a nivel mundial. Existen evidencias de varias introducciones en Cuba de propágulos de 'Cayena lisa' en el pasado siglo desde varios países como: Hawái, en el año 1947 (He *et al*., 2015), en la década del ’60 desde Martinica y Guadalupe, y del ’80 procedente de Panamá (López-Hernández y Domínguez-Martín, 2013). Asimismo, recientemente el cv. 'MD-2' se introdujo desde Venezuela y Costa Rica (Rodríguez *et al*., 2012). Este intercambio de material desde los mismos orígenes que en otras regiones del mundo, pudo haber diseminado las secuencias endógenas de ePBCOV, así como de otros agentes virales.

La PCR-Badnavirus permitió el diagnóstico y caracterización molecular de cuatro aislados de PBCOV, y una secuencia de ePBCOV. Sin embargo, este método no detecta específicamente PBCOV. Esto motivó la necesidad de implementar un método para el diagnóstico específico de PBCOV.

V.2.3.2 Diagnóstico de PBCOV por hibridación de ácidos nucleicos no radioactiva

La optimización de un método de Dot Blot (Dot Blot-PBCOV) tuvo como objetivo contar con un método para el diagnóstico de PBCOV de forma específica y en un volumen alto de muestras, ya que los cebadores Badna1a/4, utilizados en la PCR-Badnavirus, sólo detectan genéricamente caulimovirus. La sonda para detectar PBCOV se obtuvo a partir de los amplicones RT/RNasaH-PBCOV caracterizados anteriormente, con el sistema *PCR DIG-labeling and Detection kit* (Roche Diagnostics), según el fabricante.

El marcaje de las sondas se realizó en cuatro reacciones de PCR-Badnavirus con volumen final de 50 µL, utilizando como molde 10 ng del plasmidio con el amplicón RT/RNasaH-PBCOV (una reacción para cada producto obtenido a partir de cada una de las cuatro plantas caracterizadas anteriormente). Los productos de la PCR se verificaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) con tinción de bromuro de etidio a 0,5 mg/mL, según Sambrook *et al*. (1989). La sonda se separó por electroforesis y se purificó mediante el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostic).

Para desarrollar el ensayo de Dot Blot-PBCOV cada muestra de los extractos de ADN (10 µg) a analizar se resuspendió en H_2Odd en un volumen final de 20 µL, se desnaturalizó a 95 °C durante 10 min, y se enfrió inmediatamente en hielo. Las muestras se aplicaron en membranas de nylon H+ (Amersham Pharmacia Biotech), mediante el dispositivo BIO-RAD BIO-DOT (Bio-Rad) conectado al vacío. Las prehibridaciones y las hibridaciones con la sonda RT/RNasaH-PBCOV-DIG (100 ng x 10 cm^2 de membrana) se realizaron en tampón Church (Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4 10 mM pH 7,2, SDS 20 %, EDTA 1 mM y BSA 1 %), a 50 °C y 65 °C, respectivamente, en un horno de hibridación Grant BOEKEL HIR12 (Grant). Al concluir, se siguieron los procedimientos de lavado y detección quimioluminiscente con el sistema *Dig Luminescent Detection Kit* (Roche) y filmes de rayos X Omat-S film (Kodak).

Para determinar el límite de detección del Dot Blot-PBCOV se transfirieron a la membrana cantidades de 15; 1,5; 0,15; 0,015; y 0,0015 ng de uno de los clones pGEMT-Easy Vector + RT/RNasaH-PBCOV LH ER-4. También se utilizó como control positivo 10 µg de ADN de la planta LH ER-4, hospedante del aislado PBCOV LH ER-4. Se utilizaron como controles negativos del ensayo 10 µg de ADN de una planta de papayo, obtenida a partir de semilla certificada en condiciones de aislamiento y de piña cv. 'MD-2' obtenida mediante el cultivo *in vitro* de meristemos (Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila)

Para todas las muestras analizadas se utilizó una repetición intra-ensayo. Se tomó como criterio de positividad una señal con intensidad tres veces mayor que las señales de fondo de los blancos experimentales, determinado por la observación visual. Se evaluó la concordancia entre los resultados del Dot Blot-PBCOV con la PCR-Badnavirus, mediante el diagnóstico por los dos métodos de un conjunto de ADN de las provincias Pinar del Río, Isla de la Juventud, Ciego de Ávila y Villa Clara, colectadas en las prospecciones.

La evaluación de una curva con cantidades decrecientes del plásmido pGEMT-Easy Vector-RT/RNasaH-PBCOV LH ER-4 mostró que la menor cantidad de este producto detectable mediante el Dot Blot-PBCOV fue de 1,5 ng (Figura 17). La sonda no reaccionó con los controles negativos de ADN de piña y papaya, y si con el control positivo de ADN de la planta

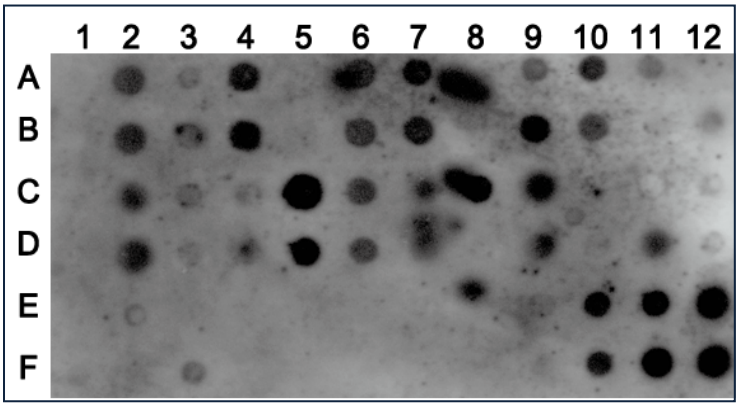


Figura 17. Detección de PBCOV mediante el Dot Blot-PBCOV en muestras de ADN total de plantas de diferentes provincias de Cuba. Carriles: **A3,B3**: PR2 ER-7; **A4,B4–A7,B7**: IJ1 ER-1, IJ1 ER-3, IJ1 ER-2, IJ1 ER-4; **A8,B8–A11,B11**: VC2 ER-1, VC2 ER-2, VC2 ER-3, VC2 ER-4; **A12,B12**: VC3 ER-3; **C3,D3–C5,D5**: VC1 ER-1, VC1 ER-2, VC1 ER-3; **C6,D6–C9,D9**: GN1 ER-1, GN1 ER-2, GN1 ER-3, GN1 ER-4; **C10,D10–C12,D12**: CA MD2-10, CA MD2-13, CA MD2-21. PR: Pinar del Río, IJ: Isla de la Juventud, CA: Ciego de Ávila. VC: Villa Clara. Controles negativos: piña cv. MD-2 obtenida mediante cultivo *in vitro* de meristemos (**A1,B1**) y papaya obtenida a partir de semilla certificada (**C1,D1**). Controles positivos: planta LH ER-4 (**A2,B2** y **C2,D2**) y curva del plásmido pGEMT-Easy Vector-RT/RNasaH-PBCOV LH ER-4 (0,015 ng; 0,15 ng; 1,5 ng; 15 ng; 150 ng) (**E8,F8–E12,F12**).

LH ER-4. El diagnóstico mediante el Dot Blot-PBCOV de una selección de plantas previamente analizadas con la PCR-Badnavirus, evidenció la presencia de este virus en un grupo de ellas y confirmó los resultados de la PCR (Figura 17).

En 19 de las 20 muestras incluidas en este análisis se verificaron señales positivas de hibridación, hasta tres veces mayor que la menor concentración de ADN del plamidio pGEMT-Easy Vector-RT/RNasaH-PBCOV LH ER-4. Los controles positivos (extractos de LH ER-4) también reaccionaron con señales fuertes de hibridación (Figura 17, A2, B2, C2 y D2). Los resultados del diagnóstico mediante el Dot Blot-PBCOV y la PCR-Badnavirus coincidieron en 19 de las 20 muestras analizadas (Tabla 13), lo que significó un 95 % de coincidencia entre ambas metodologías. Solamente el extracto de ADN de la muestra de la planta IJ1 ER-4, resultó positivo en la PCR-Badnavirus y negativo en el Dot Blot-PBCOV (Figura 17). Tomando en consideración estos resultados, se seleccionó el Dot Blot-PBCOV para realizar los subsiguientes ensayos de diagnóstico.

Los amplicones de RT/RNasaH obtenidos a partir de los cuatro aislados de PBCOV caracterizados durante este estudio permitieron obtener una sonda (RT/RNasaH-PBCOV) con la que se desarrolló un ensayo de dot blot no radioactivo para el diagnóstico de PBCOV (Dot Blot-PBCOV). Este permitió realizar el diagnóstico específico de PBCOV, y el análisis de un alto número de muestras. El Dot Blot-PBCOV detectó específicamente PBCOV en un conjunto de muestras diagnosticadas previamente como infectadas mediante la reacción de PCR-badnavirus, con un 95 % de concordancia entre los resultados de los dos métodos.

Tabla 13. Coincidencia en el diagnóstico mediante la PCR-Badnavirus y Dot Blot-PBCOV.

Muestra	Resultado del diagnóstico		Muestra	Resultado del diagnóstico	
	PCR-Badnavirus	Dot Blot-PBCOV		PCR-Badnavirus	Dot Blot-PBCOV
PR2 ER-7	+	+	VC1 ER-1	-	-
IJ1 ER-1	+	+	VC1 ER-2	-	-
IJ1 ER-2	+	+	VC1 ER-2	+	+
IJ1 ER-3	+	+	GN1 ER-1	+	+
IJ1 ER-4	+	-	GN1 ER-2	+	+
VC2 ER-1	-	-	GN1 ER-3	-	-
VC2 ER-2	+	+	GN1 ER-4	+	+
VC2 ER-3	+	+	CA MD2-10	-	-
VC2 ER-4	-	-	CA MD2-13	-	-
VC3 ER-3	+	+	CA MD2-21	-	-

+: positivo y -: negativo en el respectivo diagnóstico.

En general, los resultados de esta investigación permitieron afirmar la existencia de PBCOV y ePBCOV en las muestras analizadas, lo que representó el primer informe de su presencia en plantaciones comerciales de piña de América. Los resultados permitieron reafirmar la utilidad de este método para la detección de elementos de la familia *Caulimoviridae*. La alta diversidad genética encontrada en los cuatro aislados de PBCOV pudiera sugerir una alta variedad de propiedades biológicas, hipótesis que necesitará examinarse con nuevos experimentos.

Los ensayos de detección y caracterización molecular de agentes virales en las muestras seleccionadas mostraron la presencia de los tres ampelovirus diagnosticados (PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3) y el badnavirus PBCOV en Cuba. Las metodologías de diagnóstico implementadas detectaron específicamente estos agentes. Sin embargo, estas muestras se

seleccionaron de forma limitada a partir del banco de extractos de ARN y ADN a partir de plantas con síntomas de MWP y asintomáticas. Para investigar la presencia de estos virus en las plantaciones prospectadas y su relación con los síntomas de la enfermedad, se analizó todo el banco de muestras colectadas durante las prospecciones en cada finca evaluada.

V.2.4 Relación de los agentes virales detectados con el desarrollo de síntomas de la marchitez de la piña

La presencia de los virus detectados previamente en las tres regiones geográficas de Cuba, y su infección en plantas con síntomas de MWP o asintomáticas, se examinó mediante el diagnóstico de todas las muestras colectadas durante las prospecciones (Tabla 2), mediante los ensayos de RT-PCR-HSP70h (ARN) para la detección de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 (0), y el Dot Blot-PBCOV (ADN), para PBCOV (V.2.3.2).

Las frecuencias de detección se analizaron estadísticamente mediante una comparación múltiple de proporciones por el método de Wald, para un nivel de confianza de $p<0,05$, con el software CompaProWin_2.0.1 (CENSA, Cuba). Como controles positivos en los ensayos se utilizaron los aislados de estos virus caracterizados previamente (Anexo 5). Como controles negativos se utilizaron extractos de ARN y ADN de vitroplantas de piña cv. 'MD-2', obtenidas por cultivo *in vitro* de meristemos (Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila), obtenidos mediante las metodologías descritas en los epígrafes V.2.2 y V.2.3, respectivamente, y H_2Odd como blanco experimental.

El diagnóstico mediante la RT-PCR-HSP70h y el Dot Blot-PBCOV en las 144 muestras procesadas, colectadas en fincas con áreas comerciales del cv. 'Española roja' y 'MD-2' (ver epígrafe V.2.1), mostró la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV en las tres regiones geográficas de Cuba (Tabla 14). PMWaV-2 y PBCOV se detectaron en todas las plantaciones de las provincias muestreadas. Sin embargo, PMWaV-1 no se detectó en las fincas de la Isla de la Juventud y Camagüey, y PMWaV-3 no se encontró en las fincas VC2 de Villa Clara y CM3 de Camagüey.

De las 144 plantas analizadas, 125 estuvieron infectadas por al menos uno de los cuatro virus detectados, que representó una frecuencia de detección de 86,6 % de plantas infectadas, y 13,2 % (19/144) de plantas sin infección viral detectable. La mayor frecuencia de detección se obtuvo en el diagnóstico de PMWaV-2 (61,1 %: 88/144), seguido por PBCOV (45,1 %: 65/144), PMWaV-3 (41,7 %: 60/144) y PMWaV-1 (33,3 %: 48/144) (Tabla 14). PMWaV-2 se detectó 1,8 veces más que PMWaV-1; 1,5 veces más que PMWaV-3 y 1,4 veces más que PBCOV.

En el conjunto de muestras analizadas se detectaron infecciones tanto simples como mixtas, con diferentes combinaciones de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV (Figura 18). La infección simple más frecuente fue en la que solamente se detectó PMWaV-2 (21/144), que representó el 14,6 % del total de las muestras. Las combinaciones de la infección mixta de algunos de los cuatro virus diagnosticados que con mayor frecuencia se diagnosticaron fueron PMWaV-2/PBCOV (14,6 %: 21/144) y la mezcla de PMWaV-1/PMWaV-2/PMWaV-3 (11 %: 24/144). Las otras combinaciones se detectaron con frecuencias inferiores al 10 %.

La mayoría (97,6 %: 83/88) de las plantas detectadas como positivas para PMWaV-2, tanto en infección simple, como en su combinación con PMWaV-1, PMWaV-3 y PBCOV, mostraron síntomas de MWP (Figura 18). Solamente se diagnosticaron cuatro plantas asintomáticas en la combinación PMWaV-1/PMWaV-2/PMWaV-3 infectadas con PMWaV-2 y una en la

combinación PMWaV-2/PMWaV-3. Este análisis contrastó con el de las plantas infectadas con PMWaV-1, PMWaV-3, PBCOV, ya sea en infecciones simples o en sus combinaciones donde no estuvo presente PMWaV-2, debido a que las muestras positivas provinieron de plantas asintomáticas.

Tabla 14. Presencia de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV -3 y PBCOV en 144 plantas de piña muestreadas durante las prospecciones realizadas en este estudio.

Región del país	Provincia o municipio	Finca	Muestras analizadas*	PMWaV			PBCOV
				1	2	3	
Occidental	Isla de la Juventud	IJ1	4	0	3	2	3
		IJ2	4	0	3	2	2
		IJ3	6	0	3	2	1
	Pinar del Río	PR1	4	3	4	3	2
		PR2	7	3	3	3	4
		PR3	6	1	5	2	1
	Artemisa	AR	6	2	2	1	3
	La Habana	LH	5	2	4	2	2
	Matanzas	MT1	4	2	4	2	2
		MT2	4	1	4	2	1
Central	Villa Clara	VC1	5	3	4	4	3
		VC2	4	2	3	0	2
		VC3	4	2	2	3	3
		VC4	4	2	2	2	3
		VC5	4	2	3	1	2
	Ciego de Ávila	CA	41	13	13	16	9
	Camagüey	CM1	4	0	3	1	2
		CM2	4	0	4	2	4
		CM3	2	0	2	0	2
Oriental	Granma	GR	4	2	3	1	3
	Santiago de Cuba	SC1	4	2	2	2	1
		SC2	6	1	5	3	4
	Guantánamo	GN1	4	3	3	2	3
		GN2	4	2	4	2	3
TOTAL**			**144**	**48**c	**88**a	**60**bc	**65**b
Frecuencia de detección (%)* **				**33,3**	**61,1**	**41,7**	**45,1**

*Cada muestra se analizó individualmente para detectar PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 mediante RT-PCR-HSP70h, y PBCOV por Dot Blot-PBCOV. **Letras diferentes indican valores diferentes con una $p< 0,05$. ***Determinado como la cantidad de plantas infectadas con el virus entre la cantidad de plantas analizadas multiplicado por 100.

Estos resultados sugirieron una mayor relación de PMWaV-2 con la presencia de síntomas en las plantas muestreadas que PMWaV-1, PMWaV-3 o PBCOV. Para estudiar con mayor profundidad este aspecto, se utilizaron los resultados del diagnóstico realizado, en conjunto con los síntomas de cada planta, datos que se registraron durante las prospecciones, con los cuales se determinaron las probabilidades de encontrar uno de los cuatro agentes virales en plantas con o sin síntomas.

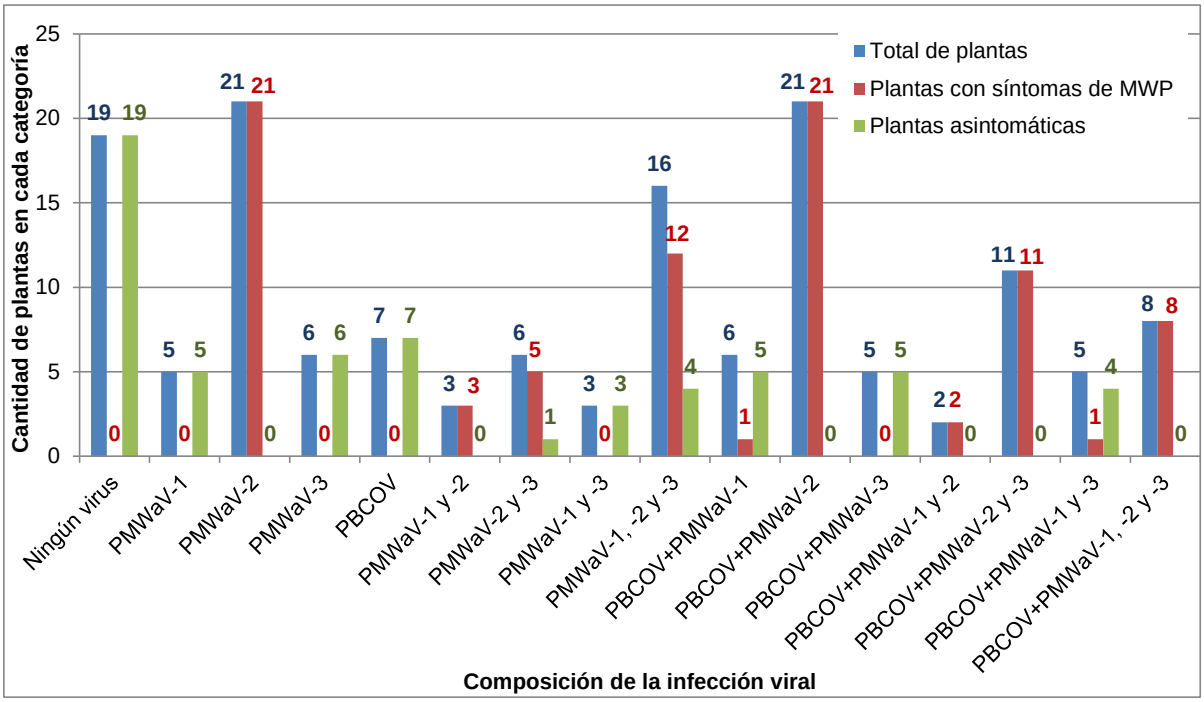


Figura 18. Resultados del diagnóstico de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV respecto al estado asintomático o sintomático (síntomas de MWP), en 144 plantas colectadas en todas las fincas inspeccionadas durante las prospecciones. PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 se diagnosticaron mediante la RT-PCR-HSP70h y PBCOV con el Dot Blot-PBCOV.

V.2.4.1 Especie viral asociada a los síntomas de MWP

V.2.4.1.1 Relación de los resultados de los métodos de diagnóstico con la presencia de síntomas de MWP en las plantas analizadas

El objetivo de este estudio fue evaluar la relación de los resultados de los métodos de diagnóstico utilizados en el epígrafe anterior [RT-PCR-HSP70h (detección de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3), o Dot Blot-PBCOV (PBCOV)], con la presencia o no de los síntomas de MWP en las plantas diagnosticadas. Este análisis se realizó con la metodología para la evaluación de métodos de diagnóstico y se asumió que alguno(os) de los cuatro virus causaran los síntomas de MWP.

Para calcular los parámetros de desempeño se construyó una tabla de contingencia con los resultados del diagnóstico de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV, de cada muestra, y la condición enferma (plantas con síntomas de MWP) o sana (ausencia de síntomas), registrados en las prospecciones (Anexo 5). Los parámetros de desempeño se calcularon según Vidal *et al*. (2012) y se interpretaron de acuerdo a Olmos *et al*. (2008) y Capote *et al*. (2009) (Anexo 4).

De las 144 muestras, 85 fueron plantas con síntomas MWP (enfermas) y 59 asintomáticas (sanas) (Tabla 2). El mayor porcentaje de plantas enfermas con resultado positivo en la RT-PCR-HSP70h para la detección de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, o en el Dot Blot-PBCOV para PBCOV (verdaderos positivos [Vp]) fue para PMWaV-2 (98 %: 83/85) (Tabla 15). Este porcentaje fue marcadamente inferior en el análisis de PMWaV-1, PMWaV-3 y PBCOV, en los que sólo se detectaron 27, 37 y 44 Vp, valores que representaron el 32 %, 44 % y el 52 % de

las plantas enfermas, respectivamente. La detección de estos virus en plantas sanas (falsos positivos [Fp]) fue superior para PMWaV-3 (39 %: 23/59), PMWaV-1 y PBCOV (36 %21/59), que para PMWaV-2 (8,5 %: 5/59).

Tabla 15. Evaluación de una población de muestras de plantas asintomáticas y enfermas (MWP sintomáticas) a través de reacciones independientes de RT-PCR para la detección de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3, y Dot Blot-PBCOV para PBCOV.

Virus	Vp	Vn	Fn	Fp	N
PMWaV-1	27	38	58	21	144
PMWaV-2	83	54	2	5	144
PMWaV-3	37	36	48	23	144
PBCOV	44	38	41	21	144

Vp: Verdaderos positivos (MWP+ y diagnóstico +), **Vn**: Verdaderos negativos (MWP- y diagnóstico -), **Fn**: Falsos negativos (MWP+ y diagnóstico -), **Fp**: Falsos positivos (MWP- y diagnóstico +) y **N**: número de muestras. **MWP+** y **-**: plantas con síntomas de la enfermedad MWP o asintomáticas. Diagnóstico + o -: muestras con diagnóstico positivo o negativo de la presencia del virus diagnosticado ya sea por RT-PCR o por Dot Blot-PBCOV.

Por otro lado, de las 59 plantas sanas, 54 resultaron negativas en la RT-PCR-HSP70h para la detección de PMWaV-2 (92 %), las que constituyeron los verdaderos negativos detectados por este método (Vn) (Tabla 15). Este resultado contrastó con los observados en el mismo análisis para PMWaV-1, PMWaV-3 y PBCOV, en los que se obtuvieron 38, 36 y 38 resultados Vn, que representaron el 64 % y 61 % de las 59 muestras, respectivamente. Asimismo, la no detección de estas especies virales en plantas enfermas (falsos negativos [Fn]) fue superior para PMWaV-1 (68 %: 58/85) y PMWaV-3 (57 %: 48/85), que para PMWaV-2 (2 %: 2/85).

La prevalencia de plantas enfermas en la población de 144 muestras evaluadas fue del 59 % (Tabla 16). La probabilidad de que el resultado de uno de los cuatro métodos de diagnóstico utilizados fuera positivo en una planta enferma (sensibilidad, Se), fue superior en el diagnóstico de PMWaV-2 (98 %), con respecto a los demás virus examinados: PMWaV-1 (32 %), PMWaV-3 (44 %) y PBCOV (54 %).

Asimismo, la probabilidad de que el resultado de las pruebas fuera negativo en una planta sana (especificidad, Es) fue superior para la RT-PCR-HSP70h para el diagnóstico de PMWaV-2 (92 %), con respecto a PMWaV-1 (64 %), PMWaV-3 (61 %) y PBCOV (24 %). Los únicos parámetros que sobrepasaron el 90 % de probabilidades fueron los correspondientes a la RT-PCR-HSP70h para el diagnóstico de PMWaV-2.

Tabla 16. Indicadores de desempeño determinados para la RT-PCR-HSP70h en la detección de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3.

Virus	P	Se	Es	Ef	VPp	VPn	RVp	RVn
PMWaV-1	0,59	0,32	0,64	0,45	0,56	0,40	0,89	1,06
PMWaV-2	0,59	0,98	0,92	0,95	0,94	0,96	11,52	0,03
PMWaV-3	0,59	0,44	0,61	0,51	0,62	0,43	1,12	0,93
PBCOV	0,59	0,52	0,64	0,57	0,68	0,48	1,45	0,75

P: Prevalencia, **Se**: Sensibilidad Diagnóstica, **Es**: Especificidad Diagnóstica, **Ef**: Eficacia, **VPp**: Valor Predictivo de Positividad, **VPn**: Valor Predictivo de Negatividad, **RVp**: Razón de verosimilitud positiva y **RVn**: Razón de verosimilitud negativa.

La mayor probabilidad de que en una planta enferma, el resultado del diagnóstico fuera positivo (valor de predictividad positivo, VPp) fue para la detección de PMWaV-2 (94 %),

superior a la de PMWaV-1 (56 %), PMWaV-3 (62 %) o PBCOV (67 %) (Tabla 16). De forma similar, la mayor probabilidad de que en una planta sana el resultado del método de diagnóstico fuera negativo (valor de predictividad negativo, VPn) fue para PMWaV-2 (96 %), superior respecto a las otras metodologías que no sobrepasaron el 48 %. Las razones de verosimilitud positiva y negativa (RVp y RVn, respectivamente) fueron similares para los ensayos RT-PCR-HSP70h-PMWaV-1, PMWaV-3, y PBCOV y difirieron de los encontrados para el RT-PCR-HSP70h-PMWaV-2 (Tabla 16).

Estos resultados confirmaron las evidencias encontradas en la determinación de la distribución de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV que sugirieron la mayor relación de PMWaV-2 con los síntomas de MWP. Sin embargo, este análisis es dependiente de los parámetros de desempeño analítico (sensibilidad y especificidad analíticas) de las metodologías de diagnóstico empleadas. Para demostrar definitivamente la relación entre la especie viral y los síntomas de MWP se realizó un procesamiento estadístico de los resultados del diagnóstico y la presencia o no de síntomas en las plantas evaluadas.

V.2.4.1.2 Relación estadística de los agentes virales detectados con la MWP

La asociación de la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV con los síntomas de la enfermedad MWP se realizó mediante un análisis estadístico de la misma forma que el realizado por Gambley *et al*. (2008a) en Australia. Se utilizó en el análisis los resultados del diagnóstico de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV en la población de 144 muestras de campo, y la condición enferma (plantas con síntomas de MWP) o sana (ausencia de síntomas), registrados durante las prospecciones (Anexo 5).

De acuerdo con esta metodología, se construyó una tabla de contingencia de dimensión 16 combinaciones de la infección simples o mixta de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV [(PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PBCOV, PMWaV-1+PMWaV-2, PMWaV-2+PMWaV-3, PMWaV-1+PMWaV-3, PMWaV-1+PMWaV-2+PMWaV-3, PMWaV-1+PBCOV, PMWaV-2+PBCOV, PMWaV-3+PBCOV, PMWaV-1+PMWaV-2+PBCOV, PMWaV-2+PMWaV-3+PBCOV, PMWaV-1+PMWaV-3+PBCOV, PMWaV-1+PMWaV-2+PMWaV-3+PBCOV y ningún virus)] x 2 (estado de la planta enferma o sana). Se inicializó un modelo loglineal jerárquico, saturado de orden 2, con todas las interacciones posibles, y se eliminaron progresivamente los términos no significativos con $p>0,05$, con el uso del paquete de programas de estadística SPSS (IBM SPSS Statistics versión 20).

El análisis del conjunto de 144 muestras analizadas por las metodologías de RT-PCR y el Dot Blot-PBCOV mediante el modelo estadístico loglineal, mostró relación entre las variables presencia de alguno de los cuatro virus y sus combinaciones en las infecciones mixtas, con el estado sanitario de la planta, con significación $p<0,01$ (Anexo 9). De las 144 plantas analizadas, el 14,6 % (21/144) contuvo una infección simple por PMWaV-2 y todas fueron plantas enfermas (Tabla 17). El análisis estadístico mostró una asociación significativa entre la presencia de esta especie viral y los síntomas de MWP ($p<0,01$) (Tabla 18).

Este resultado difirió de los obtenidos para los otros tres virus incluidos en este análisis, los cuales mostraron cierta asociación con la ausencia de síntomas, más que con su presencia, dado por su coeficiente positivo del parámetro Z. PMWaV-1 se detectó como infección simple en el 3,5 % de las plantas analizadas (5/144), que se clasificaron como sanas (Tabla 17) y su presencia no tuvo un efecto significativo en cuanto al estado sintomático, más bien con el estado sano con $p<0,1$ ($p=0,081$) (Tabla 18). PMWaV-3 y PBCOV se encontraron en el 4,2 % (6/144) y 4,7 % (7/144) de las plantas (Tabla 17), todas en plantas sanas. La infección por

estos virus no se asoció con los síntomas de la enfermedad, sino de forma similar a PMWaV-1, con el estado sano (Z>0) con $p<0,1$ y $p<0,05$, respectivamente (Tabla 18).

Tabla 17. Resultados del diagnóstico de las 144 muestras según la combinación viral y el estado sanitario de la planta que formaron la tabla de contingencia utilizada para el análisis estadístico.

Combinación viral en la planta	Estado sanitario		Total
	Sanas	Enfermas	
PMWaV-1	5	0	5
PMWaV-2	0	21	21
PMWaV-3	6	0	6
PBCOV	7	0	7
PMWaV-1+PMWaV-2	0	3	3
PMWaV-2+PMWaV-3	1	5	6
PMWaV-1+PMWaV-3	3	0	3
PMWaV-1+PMWaV-2+PMWaV-3	3	12	15
PMWaV-1+PBCOV	5	1	6
PMWaV-2+PBCOV	0	21	21
PMWaV-3+PBCOV	5	0	5
PMWaV-1+PMWaV-2+PBCOV	0	2	2
PMWaV-2+PMWaV-3+PBCOV	0	11	11
PMWaV-1+PMWaV-3+PBCOV	5	1	6
PMWaV-1+PMWaV-2+PMWaV-3+PBCOV	0	8	8
Ningún virus	19	0	19
Total	**59**	**85**	**144**

Las combinaciones virales que se asociaron con la presencia de síntomas en las plantas (Z<0) fueron aquellas en las que siempre se encontró PMWaV-2: PMWaV-1/PMWaV-2, PMWaV-2/PMWaV-3, PMWaV-1/PMWaV-2/PMWaV-3, PMWaV-2+PMWaV-3, PMWaV-2/PBCOV, PMWaV-1/PMWaV-2/PBCOV, PMWaV-2/PMWaV-3/PBCOV y PMWaV-1/PMWaV-2/PMWaV-3/PBCOV (Tabla 18). Sin embargo, en estas interacciones sólo se asociaron significativamente con $p<0,05$, la infección mixta PMWaV-2/PBCOV, PMWaV-2/PMWaV-3/PBCOV y PMWaV-1/PMWaV-2/PMWaV-3/PBCOV.

Las metodologías de diagnóstico implementadas (RT-PCR-HSP70h y Dot Blot-PBCOV) diagnosticaron con alta especificidad la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV en un conjunto de 144 muestras de plantas de piña colectadas en plantaciones comerciales de todo el país. Las frecuencias de detección de plantas infectadas con PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV en las 144 muestras analizadas fueron superiores al 30 % y fue PMWaV-2 la especie detectada con mayor frecuencia (61,1 %).

Las frecuencias de detección de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 verificadas durante este estudio en fincas de varias provincias de Cuba, difirieron de las informadas en estudios similares realizados en Hawái y Australia. En en plantaciones del cv. 'Cayena lisa' de Hawái, las incidencias de PMWaV-1 fueron superiores a las de PMWaV-2 y PMWaV-3, sus valores variaron entre el 0 y 100 %, 0 al 20 % y 0 a 22 %, respectivamente (Hu *et al*., 1997; Sether *et al*., 2001, 2005b). En los estudios en el cv. 'Cayena lisa' en Australia, PMWaV-1 y PMWaV-3 fueron los virus detectados con mayor frecuencia (78,5 % y 67,5 %, respectivamente), mientras que PMWaV-2 sólo se diagnosticó con el 25 % (Gambley *et al*., 2008a).

Tabla 18. Resumen de la estimación de los parámetros del modelo loglineal. En negrita se señalan las cominaciones de la composición viral con el estado sanitario en las que el coeficiente Z resultó negativo y fue significativo.

Composición viral x estado sanitario	Estima-ción	Error típico	Z	Signifi-cación	Intervalo de confianza al 95 %	
					Inferior	Superior
PMWaV-1	1,239	0,711	1,743	0,081	-0,154	2,633
PMWaV-2	**-1,840**	**0,690**	**-2,668**	**0,008**	**-3,192**	**-0,488**
PMWaV-3	1,323	0,707	1,872	0,061	-0,062	2,708
PBCOV	1,394	0,703	1,982	0,047	0,016	2,773
PMWaV-1+PMWaV-2	-0,933	0,727	-1,283	0,199	-2,357	0,492
PMWaV-2+PMWaV-3	-0,609	0,462	-1,318	0,188	-1,516	0,297
PMWaV-1+PMWaV-3	1,013	0,727	1,394	0,163	-0,411	2,438
PMWaV-1+PMWaV-2+PMWaV-3	-0,470	0,307	-1,532	0,125	-1,072	0,131
PMWaV-1+PBCOV	0,690	0,462	1,492	0,136	-0,216	1,596
PMWaV-2+PBCOV	**-1,840**	**0,690**	**-2,668**	**0,008**	**-3,192**	**-0,488**
PMWaV-3+PBCOV	1,239	0,711	1,743	0,081	-0,154	2,633
PMWaV-1+PMWaV-2+PBCOV	-0,764	0,744	-1,028	0,304	-2,222	0,693
PMWaV-2+PMWaV-3+PBCOV	**-1,527**	**0,696**	**-2,194**	**0,028**	**-2,892**	**-0,163**
PMWaV-1+PMWaV-3+PBCOV	0,590	0,472	1,250	0,211	-0,335	1,514
PMWaV-1+PMWaV-2+PMWaV-3+PBCOV	**-1,376**	**0,701**	**-1,963**	**0,050**	**-2,750**	**-0,002**

Asimismo, los aislados cubanos de PBCOV se detectaron en el 45,1 % de las muestras diagnosticadas. Esta frecuencia de detección fue similar a la encontrada en Hawái por Sether *et al*. (2012), quienes informaron incidencias de PBCOV-HI1 (aislado de PBCOV de Hawái) en dos híbridos comerciales de piña ('PRI 73-114' y 'PRI 73-50'), que variaron del 34 % al 68 %. En Australia no se han conducido experimentos para determinar la incidencia de la presencia de PBCOV ni PBERV, los dos badnavirus encontrados en plantaciones comerciales de este país (Gambley *et al*., 2008b).

Estos son los primeros registros de porcentajes de detección de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV, en plantaciones comerciales de piña de Cuba. Aunque las investigaciones previas a este trabajo informaron la presencia de partículas closterovirales y posteriormente, la caracterización de un aislado cubano de PMWaV-2 (Borroto *et al*., 1998, 2007), no se determinó su presencia en plantaciones comerciales del país. Las altas frecuencias de detección, en conjunto con la detección de los virus en la mayoría de las fincas prospectadas, indican la amplia presencia de estos agentes y llama la atención sobre el riesgo que representa su distribución en las plantaciones de piña de Cuba.

El análisis de las frecuencias de detección mostró que el mayor porcentaje de plantas sintomáticas que contuvo uno de los cuatro virus diagnosticados fue el de la infección simple de PMWaV-2 (98 %), mientras que el 8,5 % de las plantas asintomáticas contuvo este virus. Este resultado fue similar a los obtenidos en Hawái, donde el 100 % de las plantas analizadas con síntomas de MWP, estaban infectadas con PMWaV-2 y solo el 12 % de las asintomáticas reaccionaron positivamente en el diagnóstico de este virus (Sether *et al*., 2001). Estos resultados indicaron que de los agentes diagnosticados, PMWaV-2 podría ser la especie relacionada con los síntomas encontrados en las plantaciones prospectadas.

Los resultados del diagnóstico de PMWaV-1, PMWaV-3 y PBCOV en las muestras analizadas, mostraron porcentajes similares de detección en plantas sintomáticas y asintomáticas. Asimismo, este análisis coincidió con el realizado en Hawái para PMWaV-1,

especie que al detectarse en el 80 % de las plantas con síntomas de MWP y en el 78 % de las plantas asintomáticas, se descartó como la asociada a los síntomas de MWP (Sether *et al*., 2001).

Los análisis también revelaron una alta frecuencia de infecciones mixtas por las cuatro especies virales diagnosticadas, con mayores porcentajes en las combinaciones en las que PMWaV-2 estuvo presente en la mezcla. La unión entre patógenos coinfectando un mismo hospedante puede conducir a un amplio grupo de interacciones entre las que se incluyen la facilitación, el antagonismo, la sinergia o la neutralidad. Aunque depende de varios factores, una de las interacciones más frecuente es el efecto aditivo de los síntomas causados por cada patógeno en el hospedante, lo que puede conllevar a un desarrollo más rápido de la enfermedad (Seabloom *et al*., 2015).

Así mismo, la infección por varios agentes virales en un mismo hospedante puede propiciar la ocurrencia de eventos de recombinación entre los genomas de los mismos. Los cultivos sometidos a una constante amenaza por las infecciones virales, los cuales desvían la maquinaria del hospedante para su propia reproducción. Las plantas y los virus desarrollan constantemente cambios evolutivos con el objetivo de crear estrategias de defensa y contradefensa que conlleven a la convivencia (Islam *et al.*, 2017). En este sentido, los eventos de recombinación entre genomas virales es una de las principales fuerzas que ha moldeado la estructura genética y diversidad de los closterovirus y badnavirus (Hull, 2009; Rubio *et al*., 2013; Islam *et al.*, 2017).

Al comparar los genomas de PMWaV-2 y PMWaV-1 o PMWaV-3, se observan diferencias que incluyen la presencia de varios ORF al extremo 3' del genoma de PMWaV-2 que no están presentes en PMWaV-1 o PMWaV-3 (Gambley y Thomson, 2015). Dey *et al*. (2015) demostraron algunos de estos ORF presentes en PMWaV-2 y perdidos en PMWaV-1 o PMWaV-3, específicamente los ORFs que codifican los productos p20 y p22, potencian los mecanismos de silenciamiento génico a niveles local (p20) y sistémico (p20 y p22).

Por otra parte, la recombinación *in vivo* es una de las características de la replicación de los caulimovirus, y las estimaciones filogenéticas, sugieren que ha sido un mecanismo importante en la evolución de estos virus. Este mecanismo ofrece significativas ventajas para el incremento de la diversidad genética y la adaptabilidad en la familia (Almeyda *et al*., 2014).

En este estudio se encontraron diversas combinaciones de la infección por los ampelovirus PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3, y estos con el badnavirus PBCOV. Además se encontró una secuencia integrada de ePBCOV, que pudiera interactuar con PBCOV si ocurriera una infección de estos en un mismo hospedante. De este modo, la amplia presencia de infecciones mixtas detectadas, constituye un riesgo importante tanto por la posible interacción de sumatoria de los efectos en la fisiología de sus hospedantes, como por proveer escenarios para la recombinación y generación de nuevas variantes virales.

La evaluación de los resultados del diagnóstico para las cuatro especies virales detectadas mostró que: (*i*) PMWaV-2 fue la única especie viral que con una probabilidad mayor de 90 % se encontró en las plantas enfermas (Es y Se), (*ii*) los valores de predictividad positivo y negativo aseguraron con probabilidades superiores al 95 % que PMWaV-2 se encuentra en las plantas enfermas y está ausente en las plantas sanas, (*iii*) los valores de estos cuatro parámetros en los ensayos de RT-PCR-HSP70h-PMWaV-1 y PMWaV-3, y el Dot Blot-PBCOV mostraron una baja probabilidad, y (*iv*) las razones de verosimilitud indicaron que de las cuatro

técnicas evaluadas, la única metodología que correctamente identifica la presencia o ausencia de un patógeno en las plantas enfermas o sanas fue la RT-PCR-HSP70h-PMWaV-2.

Paralelamente, los parámetros de desempeño determinados para la RT-PCR-HSP70h para la detección de PMWaV-2, mostró que el método es útil para su uso en la certificación del material de propagación de piña como libre de este virus. El análisis de las razones de verosimilitud de la RT-PCR-HSP70h-PMWaV-2 (11,52 [RVp] y 0,03 [RVn]) se encontró entre los límites adecuados para un método de diagnóstico. Estos valores son aceptados entre los límites de mayores de 1 para la RVp y menores de 0,1 para la RVn. Mientras más alta sea la RVp y más baja la RVn, el método se cataloga como mejor para explicar el desarrollo de la enfermedad (Capote *et al*., 2009; Massart *et al*., 2009, Saunders *et al*., 2013).

Valores similares en los parámetros de desempeño han validado el uso de varias metodologías para la certificación del material de propagación de diversos cultivos. Por ejemplo, la nPCR para la detección de *Candidatus* Liberibacter asiaticus relacionada con la enfermedad huanglongbing de los cítricos (HLB), mostró parámetros de desempeño en la evaluación de muestras de campo de Cuba similares a los encontrados en este estudio (Collazo *et al*., 2011). La detección por PCR de fitoplasmas y rickettsia en plantas de papayo con síntomas del cogollo arrepollado (del inglés *papaya bunchy top*, PBT) también mostró parámetros similares (Acosta *et al*., 2011).

El análisis de los resultados del diagnóstico de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3, en correspondencia con el estado sanitario de las plantas en un modelo loglineal saturado de órden 2, mostró la asociación de la presencia de PMWaV-2 con la presencia de síntomas de la enfermedad MWP en las plantas. Asimismo, la infección mixta de este virus con cualquiera de las otras dos especies, o la presencia de las tres especies, se asoció igualmente con la presencia de los síntomas de MWP en las plantas de piña.

Un análisis similar se utilizó en Australia por Gambley *et al*. (2008a) para determinar la especie asociada a la MWP en cuatro campos experimentales diferentes. Únicamente en uno de los cuatro campos se encontró una asociación entre la presencia de PMWaV-2 y la enfermedad. En los otros tres campos, PMWaV-1 y PMWaV-3 fueron las especies que más se relacionaron con la presencia de los síntomas, aunque en el primer campo, descrito anteriormente, se encontraron estos virus en plantas sintomáticas y asintomáticas.

Sin embargo, en Hawái, Sether y Hu (2002a) utilizaron una metodología diferente para determinar la asociación de alguna de las especies PMWaV-1 o PMWaV-2, o del badnavirus PBCOV, con la inducción de los síntomas de MWP. En este experimento se contó con plantas infectadas sólo con PMWaV-1, PMWaV-2 o PBCOV, y se expusieron a la alimentación con cochinillas en uno de los experimentos, y plantas infectadas con los virus sin la presencia de cochinillas en otro. Únicamente desarrollaron los síntomas las plantas que estuvieron infectadas por PMWaV-2 y expuestas a la alimentación por cochinillas.

Los resultados evidenciaron que PMWaV-2 es la especie asociada a la enfermedad en Cuba, lo que coincidió con los estudios realizados por Sether y Hu (2002a) en Hawái. No obstante, aún en ausencia de MWP, las infecciones por PMWaV-1 se han correlacionado con reducción en los rendimientos que varian entre 5 % y 15 % de la cosecha (Sether y Hu, 2001, 2002b).

Debido a la amplia relación existente en cuanto a las características biológicas de PMWaV-1 y PMWaV-3, aunque no se han hecho estudios que estimen el daño que ocasiona la infección por esta última especie viral, se plantea que puede ser similar a los producidos por PMWaV-1 (Sether y Hu, 2002b). Aunque estas dos especies virales no se asocien con la MWP, el efecto en

la reducción en los rendimientos, pudiera ser aditivo en sus infecciones mixtas con PMWaV-2, evento ampliamente presente en las plantaciones prospectadas.

Los métodos de diagnóstico desarrollados se implementaron en un servicio científico-técnico que permite la certificación del material de propagación de piña tanto de las empresas que producen ets efrutal, como de las biofábricas que comercializan vitroplantas de piña a otros países. Sin embargo, el costo por análisis de RT-PCR es alto. Como una solución para abaratar estos costos se evaluó un procedimiento para la obtención de extarctos de ácidos nucleicos que contuviran una mezcla de ADN y ARN con calidad suficiente para ensayos de PCR, RT-PCR y Dot Blot. Además, se estudió la obtención de las proteínas de cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 como las bases para la implementación futura de métodos de diagnóstico mediante inmunoreacciones. Estos aspectos se discuten a continuación.

V.2.5 Evaluación de un método de extracción de mezclas de los ácidos nucleicos ADN y ARN que permita la detección simultanea de ampelovirus y badnavirus

En este trabajo se evaluó la eficacia de un procedimiento descrito anteriormente en la literatura para la obtención de extractos de ácidos nucleicos (mezcla de ADN/ARN) (Oñate-Sánchez y Vicente-Carbajosa, 2008), y que se referirá como método de pH bajo o método 1. El protocolo contiene los siguientes pasos:

- Macerar 100 mg del tejido vegetal fuertemente hasta que quede un polvo muy fino. La maceración puede realizarse en microtubos de 1,5 ml con pistilo o en morteros con nitrógeno líquido.
- Añadir 600 µl de solución de lisis celular (SDS 2 %, Citrato de sodio 68 mM, Ácido cítrico 132 mM, EDTA 1 mM, pH 4-4,5) y homogenizar rápidamente (vortex, tapar e invertir el tubo); incubar a temperatura ambiente por 5 min.
- Añadir 200 µl de la solución de precipitación de ADN (Ácido cítrico 1 M, Citrato de sodio 0,5 M, NaCl 5 M, NH_4Ac 7,5 M) y homogenizar (vortex, tapar e invertir el tubo); incubar a 4 °C por 10 min.
- Centrifugar a 16 000 g por 20 min; transferor el sobrenadante (~300 µl) a un nuevo tubo. Repertir este paso una vez.
- Añadir 600 µl de isopropanol y homogenizar (invertir tubo); centrifugar a 16 000 g por 1 min y botar el sobrenadante.
- Lavar el pellet con 300 µl etanol 75 % (invertir tube); centrifugar a 16 000 g por 1 min y botar el sobrenadante.
- Secar el pellet por 5 min. Resuspender el pellet en 50 µl de agua tratada con DEPC.
- Chequear la concentración y calidad de los extractos.

Este procedimiento se utilizó para la obtención de la mezcla de ADN/ARN a partir de 100 mg de tejidos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), naranjo Dulce 'Pineapple' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), limero 'Mexicano' (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.) y cidro 'Etrog' (*C. medica* L.).

La integridad de la mezcla de ácidos nucleicos obtenidos se evaluó mediante electroforesis no desnaturlizante en gel de agarosa al 1,5 % y se comparó a los extractos obtenidos a partir del procesamiento de la misma cantidad de tejido de cada especie mediante los procedimientos del reactivo TRIzol (Ambion, Life technologies) (denominado en este estudio como método 2) y el sistema RNeasy plant mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) (método 3). Los ácidos nucleicos se cuantificaron mediante espectofotometría en un NanoDrop™ 1000 (Thermo

Scientific, Whaltham, MA, USA) y se calculó la relación entre las absorbancias a las longitudes de onda A260/230 y A260/280, para determinar la calidad.

La concentración de los extractos obtendios fueron similar para las especies tomate, papa y cidro 'Etrog' cuando se utilizaron los métodos 1 y 2 (entre 480 y 1900 ng/µl) (Tabla 19). En el caso del limero 'Mexicano', la concentración obtenida fue el doble cuando se utilizó el método 2, que con el 1. Sin embargo, la concentración de los extractos obtenidas mediente el método 3 fue superior respecto al 1 en las cuatro especies utilizadas (Tabla 19).

Tabla 19. Cuantificación y rangos de absorbancia (A260/230 y A260/280) determinados mediante espectrometría de los extractos de ácidos nulceicos obtenidos mediante los tres métodos ensayados.

Método de extracción de los ácidos nucleicos	Especie vegetal	Concentración promedio* (ng/µL)	Relación 260/280*	Relación 260/230*
(1) pH Bajo	Tomate	782,4±25	1,72±0,01	2,10±0,02
	Papa	1272,6±4	1,70±0,01	1,86±0,01
	Limero 'Mexicano'	483,4±1	1,79±0,00	1,74±0,00
	Cidro 'Etrog'	1944,0±306	1,72±0,05	2,07±0,06
(2) TRIZOL (Invitrogen)	Tomate	758,5±30	2,00±0,03	1,25±0,04
	Potato	1250,1±39	2,07±0,01	1,86±0,03
	Limero 'Mexicano'	808,2±50	1,96±0,02	1,03±0,03
	Cidro 'Etrog'	1838,9±7	2,05±0,01	1,48±0,01
(3) RNeasy plant mini kit (Qiagen)	Tomate	579,8±160	2,10±0,02	2,29±0,04
	Potato	892,8±7	2,12±0,01	2,21±0,01
	Limero 'Mexicano'	254,7±4	2,11±0,01	2,08±0,02
	Cidro 'Etrog'	678,2±73	2,11±0,01	2,11±0,04

* Los valores están expresados como la media de tres determinaciones para cada muestra y la desviación estándar.

Por otra parte, la absorbancia a 260/280 para los tres métodos utilizados varió entre 1,70 y 2,11, lo que sugirió que no hubo contaminación con proteínas en los extractos obtenidos. Sin embargo, los rangos de absorbancia a 260/230 variaron entre 1,03 y 2,29, menores en las muestras del método 2, lo que pudiera indicar la presencia de trazas de contaminación con compuestos fenólicos debido al reactivo TRIzol.

No se observó degradación de las bandas de los ARN ribosomales en los extractos obtenidos mediante los tres métodos evaluados (Figura 19). Para los métodos 1 y 3, se constató la obtención de una mezcla de ADN y ARN en las cuatro especies vegetales ensayadas, lo que se evidenció por la verificación de una banda de alto peso molecular. En los productos derivados del método 2 no se observó la obtención de dicha banda (Figura 19).

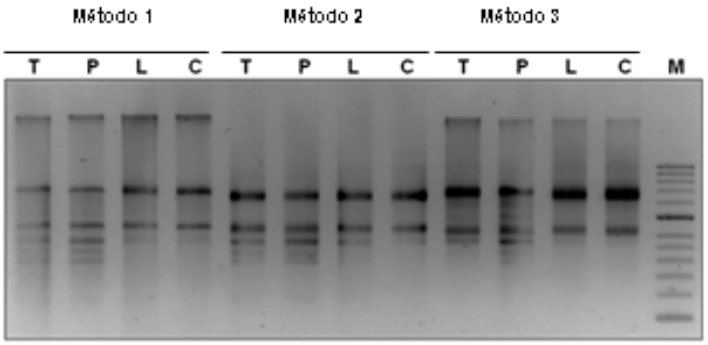


Figura 19. Productos de ácidos nucleicos obtenidos con los tres métodos evaluados (1: pH bajo; 2: TRIzol (Ambion, Life technologies) y 3: columnas spin (RNeasy plant mini kit, QIAGEN) utilizando tejidos de tomate (T), papa (P), limero 'Mexicano' (L) y cidro 'Etrog' (C), M: Marcador de peso escalera HyperLadder™ 50bp (Bioline).

Los ARN extraídos con el método 1 se utilizaron en ensayos de RT-PCR para la detección de begomovirus (según Wyatt y Brown, 1996), *Tomato chlorosis virus* (ToCV, *Closteroviridae*: *Crinivirus*) (según Dovas *et al*., 2002), *Potato virus* Y (PVY, *Potyviridae*: *Potyvirus*) (de acuerdo con los propuesto por Zheng *et al*., 2010), *Citrus tristeza virus* (CTV, *Closteroviridae: Closterovirus)* (con los métodos Rubio *et al*., 2001; Sambade *et al*., 2003; Iglesias *et al*., 2008), *Citrus exocortis viroid* (CEVd, *Pospiviroidae*: *Pospiviroids*), *Hop stunt viroid* (HSVd, Pospiviroidae: Hostuviroids), *Citrus viroid* lll (CVd lll, *Pospiviroidae*: *Apscaviroids*) (Bernad y Duran-Vila, 2006) y *Citrus psorosis virus* (CPsV, *Ophioviridae*: *Ophiovirus*) (Roy *et al*., 2005). Todos los virus ensayados se detectaron en los extractos derivados de cada hospedante, lo que evidenció su calidad tanto para ensayos de RT-PCR como PCR, y la detección de virus con genomas de ADN y ARN infectando un mismo hospedante (Figura 20).

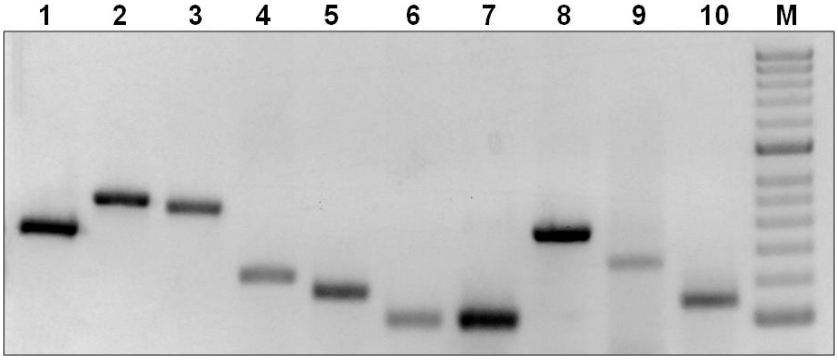


Figura 20. Electroforesis en gel de agarose al 1,5 % de los productos de RT-PCR y PCR verificados en la detección de diferentes virus y viroides en los extractos de ácidos nucleicos de tejidos de varias especies obtenidos con el uso del protocolo de extracción de ph Bajo (método 1). Carriles 1-3: amplificación de los genes p20, p23 y p25 de CTV en limero 'Mexicano' (respectivamente), 4: CPsV en naranjo dulce 'Pineapple', 5-7: viroides en cidro 'Etrog' (5: CEVd; 6: HSVd; 7: CVdlll), 8: TYLCV en tomate (lane 8) y 9 y 10: ToCV y PVY en papa M: DNA ladder HyperLadder™ 50bp (Bioline).

Para comparar los productos de ácidos nucleicos obtenidos mediante el método en evaluación (pH Bajo, método 1) con los derivados del procesamiento por el método del TRIzol (método 2) y el del sistema RNeasy de Qiagen (método 3), dos µg de cada extracto se utilizó para detectar CEVd and HSVd en cidro 'Etrog', CTV en limero 'Mexicano', ToCV y PVY en papa y begomovirus en tomate, con tres réplicas de cada ensayo en todos los casos. Adicionalmente, se utilizaron los extractos de limero 'Mexicano' en ensayos de real time RT-PCR (qRT-PCR) para detectar CTV con una sonda específica TaqMan que hibrida con la región 3' no traducible (3' UTR) del genoma viral según Bertolini *et al*. 2008.

Todos los virus y viroides examinados se detectaron utilizando los extractos obtenidos mediante el método del pH Bajo (método 1) (Figura 21). De forma similar, los ácidos nucleicos obtenidos por el métodos 2 (TRIZOL) amplificaron las bandas con los pesos esperados, except en la detección de begomovirus, los cuales tiene ADN como material genómico y este procedimiento no rinde estos productos, solo ARN. Los ácidos nucleicos obtenidos con el método 3 (sistema RNeasy de Qiagen) fallaron en la detección ToCV y tuvieron un bajo rendimiento en el diagnóstico de PVY en papa. La detección de CTV mediante qRT-PCR fue satisfactoria utilizando los extarctos obtenidos mediante los tres métodos (resultados no mostrados) (Arruabarrena *et al*., 2016).

Posteriormente el método de pH Bajo, el cual se evaluó en este trabajo, se utilizó para la detección de los ampelovirus (genomas ARN) PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 y el badnavirus PBCOV (virus ADN) en muestras co-infectadas con estos agentes. Los resultados evidenciaron que la calidad de los extractos es suficiente para la detecciónd e estos agentes con el uso de estos extarctos de ácidos nucleicos como molde en las reacciones de RT-PCR y Dot Blot (resultados no mostrados).

Aunque este procedimiento disminuye los costos del diagnóstico de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 mediante RT-PCR, aun es insuficiente para la certificación de altos volúmenes de muestras. Tomando esto en consideración, la investigación se dirigió haca la obtención de antígenos basados en las proteínas de cápside viral de estos agentes para su utilización futura en la implementación de inmunodiagnósticos.

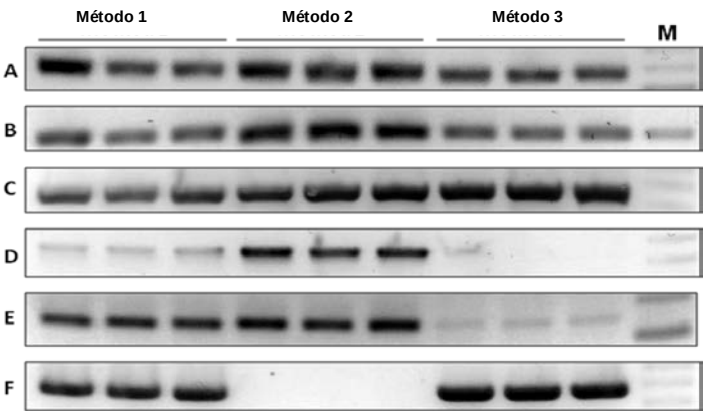


Figura 21. Productos de amplificación obtenidos a partir de extractos de ácidos nucleicos obtenidos con los tres métodos evaluados (1: pH bajo; 2: TRIzol (Ambion, Life technologies) y 3: columnas spin (RNeasy plant mini kit, QIAGEN) utilizando tejidos de tomate (T), papa (P), limero 'Mexicano' (L) y cidro 'Etrog' (C), en ensayos de RT-PCR y PCR obtenidos para la detección de CEVd (A) y HSVd (B) en cidro 'Etrog', CTV in limero 'Mexicano' (C), ToCV (D) y PVY (E) en papa y begomovirus en tomate (F). Para cada RT-PCR o PCR se utilizaron tres réplicas del ácido nucleico extraído con cada uno de los tres métodos de extracción. M: Marcador de peso escalera HyperLadder™ 50bp (Bioline).

V.2.6 Purificación de las proteínas de cápside de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 expresadas de forma heteróloga en Escherichia coli.

V.2.6.1 Expresión de forma recombinante las proteínas de cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en *E. coli*

En trabajos realizados previos a la ejecución de este proyecto se obtuvieron las construcciones para la expresión de forma heteróloga de las proteínas de cápside viral (CP) de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en el hospedero *Escherichia coli*. Estas construcciones se realizaron con el plasmidio comercial pQE-30 (Qiagen, Hilden, Alemania), con el objetivo de aprovechar la tecnología de purificación mediante cromatografía de intercambio ionico que facilita el uso de este sistema. La estrategia de clonaje que se utilizó para la obtención de las construcciones de expresión se diseñó para la ligazón del gen que codifica para la CP de cada especie viral (gen *cp*) en el sitio de múltiple clonaje del pQE-30. Siguiendo esta metodología se obtuvieron tres construcciones genéticas que se denominaron pQE-30 + *cp* PMWaV-1, pQE-30 + *cp* PMWaV-2 y pQE-30 + *cp* PMWaV-3.

Los plásmidios recombinantes se purificaron mediante el sistema *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche), siguiendo la metodología recomendada por el fabricante. La preparación de las células de *E. coli* competentes y su transformación con los plasmidios de expresión se realizaron según el método de Hanahan, 1983. Todos los métodos de trabajo usados con el ADN recombinante fueron los clásicos propuestos por Sambrook *et al.,* 1989. Los hospederos para la expresión de las proteínas heterólogas fueron las cepas de *E. coli* M15 y SG13009

derivadas de *E. coli* K12 y con fenotipo: NalS, StrS, RifS, Thi^{-},Lac^{-}, Ara^{+}, Gal^{+}, Mtl^{-}, F^{-}, $RecA^{+}$, Uvr^{+}, Lon^{+} (Qiagen).

Para realizar los análisis de expresión se inocularon colonias de *E. coli* de cada una de las cepas utilizadas, transformadas previamente con los vectores de expresión obtenidos, en tubos con 2 ml de medio LB (del inglés *Lysogeny broth* [triptona 10 g/l, NaCl 10 g/l y extracto de levadura 5 g/l]), suplementados con ampicillina 100 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml (LBAK). Se utilizó como control negativo una colonia de *E. coli* de cada cepa transformada con el plásmidio comercial pQE-30. Los cultivos se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C con agitación vigorosa. Posteriormente, se inocularon 100 µl de los pre-cultivos en *erlenmeyers* con 10 ml de medio LBAK y se dejaron crecer durante 2 horas a 37°C con agitación vigorosa. Al cabo de las dos horas se indujo la expresión con IPTG 1,0 mM. Se tomaron muestras del cultivo (1,0 ml) antes de inducir la expresión (t0), y a las dos (t1) y cuatro horas (t2) después de inducir la expresión según los procedimientos propuestos por Sambrook *et al.,* 1989.

En la electroforesis en gel de acrilamida al 12% (SDS-PAGE) del lisado de los cultivos de los clones para la expresión de la CP de PMWaV-1, pQE-30+*cp* PMWaV-1-01 y -02, se observó la aparición de las diferentes bandas de las proteínas totales solubles mayoritarias contenidas en los extractos (Figura 22). En el momento antes de la inducción (t0) el patrón de bandas que se obtuvo fue similar en los dos clones que contenían la construcción para la expresión (pQE-30+*cp* PMWaV-1-01 y -02) y las transformadas con el plasmidio pQE-30 (Figura 22, comparar carriles 1 con 2 y 3, en t0). Este resultado evidencia el fuerte control de la transcripción logrado mediante la represión potenciada por la existencia del plásmidio pREP en las cepas M-15 y SG13009.

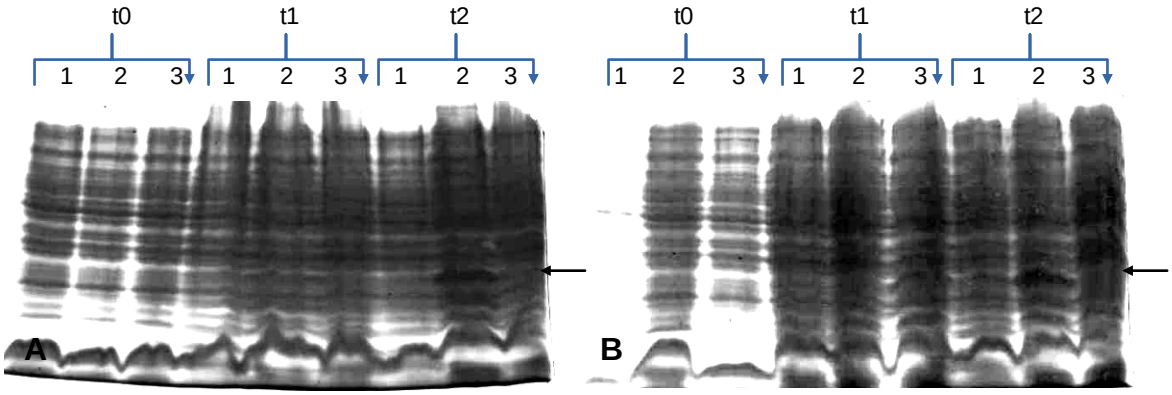


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) de los extractos de proteínas totales de cultivos de *E. coli* M15 (A) y SG13009 (B) transformadas con la construcción para la expresión de la proteína de cápside (CP) de PMWaV-1 (plásmidio pQE-30 con el gen *cp* de PMWaV-1 clonado). Grupos to, t1 y t2: momento de la inducción, y dos y cuatro horas post-inducción, respectivamente. Carriles: 1- cepa transformada con el plásmidio pQE-30 sin el gen *cp* de PMWaV-1, 2 y 3- cepas transformadas con dos clones del plásmidio de expresión pQE-30 + gen *cp* de PMWaV-1.

En los carriles correspondientes a las dos y cuatro horas después de inducidos del cultivo del clón pQE-30+*cp* PMWaV-1-01 se observó la aparición de bandas que no se encontraron en el control negativo del experimento, ni en el extracto de las células transformadas con el clon pQE-30+*cp* PMWaV-1-02 (Figura 22, comparar carriles 1 y 3 con el 2 en la región que se señala con la flecha negra). Este comportamiento se encontró tanto en los cultivos de la cepa M-15, como la SG13009, ambas transformadas con el plásmidio pQE-30+*cp* PMWaV1-01. Los

resultados fueron similares en ambas cepas y sugieren la expresión de la CP de PMWaV-1, por lo que se continuaron los trabajos solamente con la M-15.

Este experimento se repitió para verificar la expresión de la CP de las tres especies virales utilizando la cepa M-15. En la electroforesis se aplicaron volúmenes de 10 µl del lisado de 1,0 ml de cultivo, centrifugados y resuspendidos en tampón de carga (Sambrook *et al.,* 1989). El peso molecular de las proteínas se estimó con el uso de un patrón de peso molecular.

En la SDS-PAGE se observaron bandas de proteínas diferenciales en los cultivos transformados con las tres construcciones para la expresión de la CP de PMWaV-1, -2 y -3 (Figura 23, comparar carriles 2, 3 y 4 contra carril 1, bandas marcadas). Estas bandas no aparecieron en la electroforesis del extracto de la cepa transformada con el plasmidio comercial pQE-30 (Qiagen), control negativo del ensayo. Las bandas diferenciales mostraron un peso molecular entre los 25 y 35 kDa para las construcciones de expresión de la CP de PMWaV-1 y -3 (Figura 23, carriles 2 y 4, bandas marcadas), y entre los 35 y 45 kDa para la banda de la construcción de expresión de la CP de PMWaV-2 (Figura 23, carril 3, banda marcada).

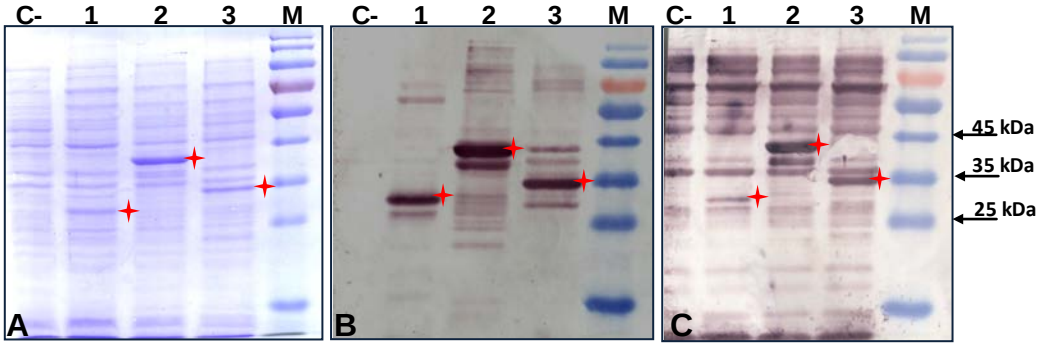


Figura 23. Análisis de expresión de la proteína de cápside (CP) de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en extractos de proteínas totales de cultivos de *Escherichia coli* cepa M-15, transformada con las construcciones genéticas: plásmidio pQE-30 (QIAGEN) con el gen *cp* de cada PMWaV clonado. A: SDS-PAGE de los extractos de proteínas totales. B y C: Western Blot con anti-His (Qiagen) y mezcla de policlonales anti-CP PMWaV-1, -2 y -3, respectivamente. Carriles: 1- cepa transformada con el plásmidio pQE-30 (control negativo), 2, 3 y 4- cepa transformada con clones pQE-30 + gen cp de PMWaV-1, -2 y -3, respectivamente, M: marcador Page Ruler Prestained proteína Ladder (Fermentas).

El peso molecular de la CP de PMWaV-1, -2 y -3, según las secuencias aminoacídica de los productos proteicos codificados en el marco de lectura abierto ORF 5 (ORF, del inglés *open reading frame*), es de 28,1 kDa, 34 kDa y 28,8-kDa, respectivamente (Melzer *et al*., 2001; Melzer *et al*., 2008; Sether *et al*., 2009). El análisis de este resultadose sugiere la expresión correcta de las proteínas CP de PMWaV-1, -2 y -3 a partir de las construcciones genéticas pQE + *cp* de cada PMWaV en la cepa M-15 de *E. coli*. Se debe mencionar que la fusión de seis aminoácidos histidinas en tándem en el extremo N-terminal de la proteína produce un aumento en el peso de las proteínas expresadas mediante este sistema (*The QIAexpressionist*, Qiagen).

La expresión de la proteína heteróloga se corroboró en ensayos de *western blot* con el uso de dos inmunoreactivos diferentes, y según la metodología propuesta por Sambrook *et al.,* 1989. Se usó un primer anticuerpo policlonal obtenido en ratón y denominado comercialmente *Mouse anti-RGS (His)*$_4$ (Qiagen). Este anticuerpo detecta las seis moléculas de histidinas fusionadas en tándem en el extremo N terminal de las construcciones genéticas en estudio. El

otro ensayo utilizó una mezcla de anticuerpos policlonales anti-CP PMWaV-1, -2 y -3 (GenScript, New Jersey, USA). Estos anticuerpos policloanes se generaron en conejo a partir de extractos de cultivos de *E. coli* que expresaron péptidos diseñados según la secuencia aminoacídica de las proteínas CP de PMWaV-1, -2 y -3 de los aislados de Hawái (número de acceso en GenBank: NC0101178, AF283103 y DQ399259, respectivamente).

Para los dos ensayos se realizaron dos electroforesis en paralelo, idénticas a la realizada previamente para verificar la expresión de las CP de PMWaV-1, -2 y -3. Al terminar la corrida electroforética las muestras separadas en los geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa cargadas positivamente (Biorad), mediante un sistema de transferencia miniprot (Biorad). Los ensayos de *western blot* se realizaron siguiendo la metodología para el análisis de transformantes a partir de colonias (página 41), propuesta en el manual *The expressionist* (Qiagen) Ambos anticuerpos (1 mg/ml) se utilizaron en concentraciones equivalentes a 1:250.

En la reacción del anti-His se observaron reacciones positivas con varias proteínas de los cultivos de *E. coli* M-15, tanto el transformado sólo con el plasmidio pQE-30, como con los clones pQE-30+*cp* de cada PMWaV (Figura 23, B). Sin embargo, en las posiciones de las proteínas sobreexpresadas de los cultivos transformado con los clones pQE-30+*cp* de cada PMWaV se observó la reacción con una banda de proteínas que no se mostró en las posiciones del cultivo del control negativo (Figura 23 B, carriles 2, 3 y 4, bandas marcadas). Estas bandas coinciden con las bandas sobreexpresadas y diferenciales a las del control negativas descritas anteriormente y cuyo peso estimado coincide con los pesos predichos para las CP de PMWaV-1, -2 y -3. Con la mezcla de anticuerpos policlonales anti CP PMWaV-1, -2 y -3 se encontraron estas mismas reacciones positivas con bandas similares a las observadas en el *western blot* con el anti His y las descritas en la electroforesis de proteínas (Figura 23 C, carriles 2, 3 y 4 bandas marcadas).

Los resultados sugirieron la expresión de las proteínas CP de PMWaV-1, -2 y -3 en los cultivos de *E. coli* cepa M-15 en las condiciones utilizadas. Estos cultivos se utilizaron para investigar si era posible purificar las proteínas con el uso de la cromatografía de intercambio ionico.

V.2.6.2 Purificación de la cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3

Las construcciones para la expresión de las proteínas CP de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 se realizaron con el uso del plásmidio pQE-30 (Qiagen) como vector de expresión (Anexo 1). El sistema de expresión de proteínas heterólogas *QIAexpress* (Qiagen) se basa en la fusión de los genes a expresar a una cola de seis aminoácidos histidina, cuya localización al extremo 5' o al 3' puede seleccionarse escogiendo un determinado vector de expresión de los que componen el sistema. El aminoácido histidina posee como grupo funcional un imidazol que se une a iones níquel, lo que posibilita se pueda utilizar un procedimiento simple de purificación mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC) en matrices de agarosa Ni-NTA (Qiagen). El plásmidio pQE-30 fusiona la cola de histidina en el extremo 5' de los genes clonados.

Siguiendo esta metodología se realizaron ensayos a pequeña escala para investigar si era posible la purificación de las proteínas CP de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3. Para este experimento se utilizó el Procedimiento de chequeo rápido de pequeños cultivos de expresión (Protocolo 5, página 45 del manual *The QIAexpressionist*, Qiagen) con algunas modificaciones. El proceso de purificación de las proteínas se realizó según indica el manual

utilizando urea 8M en el tampón de lisis. Se colectaron muestras de cada paso durante el proceso de purificación y se verificaron en electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE) según Sambrook *et al*., 1989.

En la electroforesis SDS-PAGE de los productos de la purificación de la CP PMWaV-1, -2 y -3 se verificó la ocurrencia de todos los procesos en los pasos de la purificación (Figura 24 A, B y C, respectivamente). En la segunda elusión de la purificación a partir del cultivo de la cepa de *E. coli* M-15 transformada con la construcción para la expresión de la CP de PMWaV-1 y -3 se pudo observar la aparición de la banda de peso molecular entre los 25 y 35 kDa (Figura 24 A y C, carril 7 y 9, respectivamente, ver banda marcada).

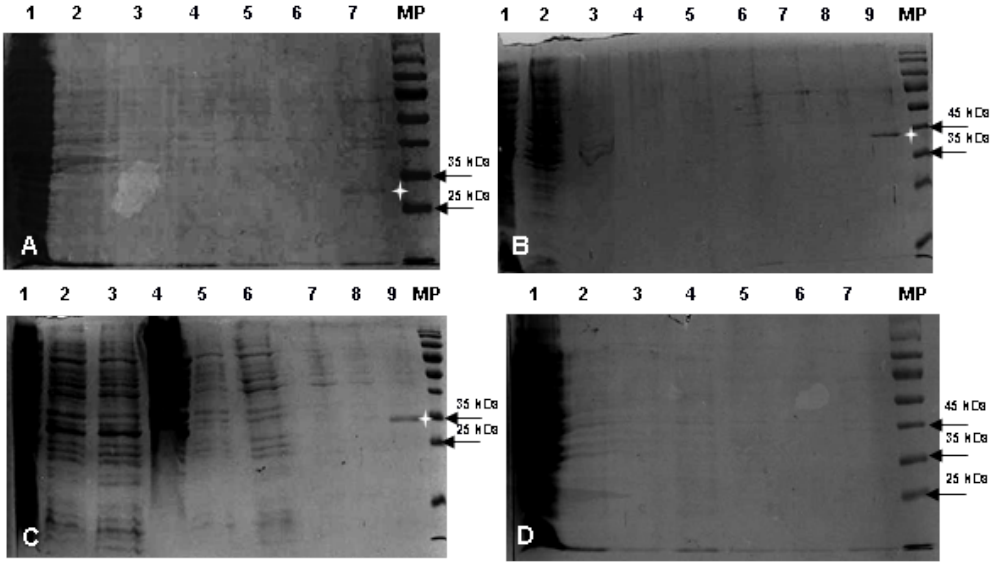


Figura 24. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) de los eluatos resultantes de la purificación de la CP de PMWaV-1 (A), PMWaV-2 (B) y PMWaV-3 (C) a partir de extractos de 10 ml de cultivos de *E. coli* cepa M15 transformada con la construcción pQE-30 con el gen *cp* de cada PMWaV clonado y con el plásmidio pQE-30 como control negativo (D). Carriles: 1: 1 ml de células centrifugadas y lisadas en tampón de lisis (tris-HCL 10 mM; NaH_2PO_4 100 mM; urea 8M; pH 8); 2: 20 µl del lisado del cultivo antes de pasar por la columna; 3: 20 µl del lisado del cultivo después de pasar por la columna; 4 y 5: 20 µl del eluato de los lavados (tris-HCL 10 mM; NaH_2PO_4 100 mM; urea 8M; pH 6,3); 6 en adelante: 20 µl de los eluatos en el tampón de elusión (tris-HCL 10 mM; NaH_2PO_4 100 mM; urea 8M; pH 4,5); MP: marcador de peso molecular *Page Ruler Prestained proteína Ladder* (Fermentas).

Estas bandas no se observaron en la electroforesis de los productos de purificación de la cepa transformada solo con el plasmidio pQE-30 (Figura 24 D, carril 7). Sin embargo, en ninguna de las dos purificaciones se obtuvo la purificación al 100 % de las proteínas de interés, pues se visualizaron otras bandas de proteínas que se co-purificaron con las proteínas de interés (CP PMWaV-1 y -3). Además, el recobrado de la proteína no fue bueno pues no se obtuvo una cantidad fácilmente detectable en la electroforesis.

Por otra parte, en la electroforesis SDS-PAGE de los productos de la purificación de la CP PMWaV-2 utilizando urea 8M como agente caotrópico para la lisis celular y solubilización no se verificó la purificación de la proteína con peso molecular entre los 35 y 45 kDa (resultados no mostrados). En la verificación de la muestra del extracto crudo, y el precipitado de la centrifugación del lisado celular, se observó la aparición de la banda sobreexpresada lo que indicó que la proteína no se solubilizó con el tampón utilizado (urea 8M). Sin embargo, al utilizar guanidinium 6M como agente caotrópico en el tampón de lisis se observó la elusión de

la proteína de peso molecular entre los 35 y 45 kDa (Figura 24 B). Esto confirmó que la solubilización en urea no ocurrió en el ensayo anterior y fue la causa de la no purificación de la CP de PMWaV-2. De la misma forma que en la purificación de la CP de PMWaV-1, no se obtuvo la purificación al 100 % de la proteína pues se visualizaron otras bandas que co-purificaron con la proteína de interés (CP PMWaV-1 o -3).

V.2.6.3 Escalado de la purificación

Una vez verificada la purificación de las proteínas CP de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 en pequeños volúmenes se investigó el escalado del proceso a un volumen mayor. Para realizar estos ensayos se siguieron las metodologías: Preparación de lisados de *E. coli* bajo condiciones desnaturalizantes y Purificación en columnas de proteínas de *E. coli* fusionadas a colas de 6–His usando Ni-NTA y bajo condiciones desnaturalizantes (Protocolo 10, página 80, y 18, página 91, respectivamente del manual *The QIAexpressionist*, Qiagen).

En la purificación de la CP de cada PMWaV se observó en la muestra del cultivo de partida la banda de la proteína de interés, con el peso estimado que coincide con el reportada para cada una de las proteínas (28,1 kDa para la CP de PMWaV-1, 33,4 kDa para la CP de PMWaV-2 y 28,8 kDa para la CP de PMWaV-3) (Figura 25, carriles 1, banda marcada). Esta banda

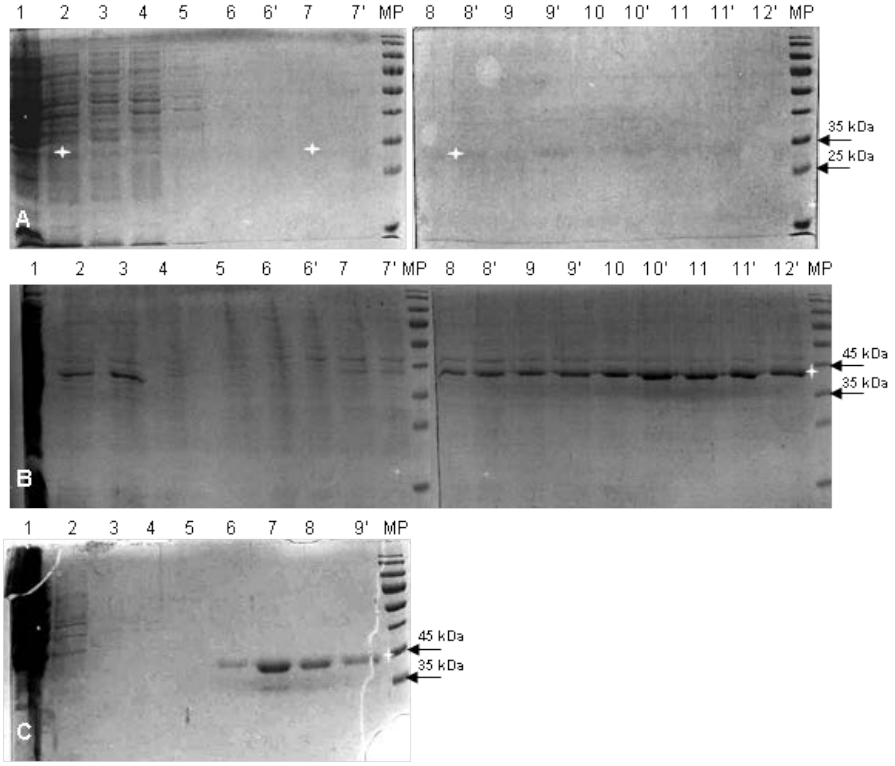


Figura 25. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) de los eluatos resultantes de las purificaciones de la CP de PMWaV-1 (A), PMWaV-2 (B) y PMWaV-3 (C) a partir de extractos de cultivos de 150 ml de *E. coli* cepa M15 transformada con la construcción pQE-30 con el gen *cp* de cada PMWaV clonado. Carriles: 1: 1 ml de células centrifugadas y lisadas en tampón de lisis (tris-HCL 10 mM; NaH_2PO_4 100 mM; urea 8M; pH 8); 2: precipitado luego del lisado celular; 3- 20 µl del lisado del cultivo antes de pasar por la columna; 4-20 µl del lisado del cultivo después de pasar por la columna; 5 y 6: 20 µl del eluato de los dos lavados en tampón de lavado (tris-HCL 10 mM; NaH_2PO_4 100 mM; urea 8M; pH 6,3); 6': 40 µl del eluato del segundo de los lavados en tampón de lavado; 7-11: 20 µl del eluato de la elusión de los productos en tampón de elusión (tris-HCL 10 mM; NaH_2PO_4 100 mM, urea 8M; pH 4,5); 7'-12': 40 µl del eluato de la elusión, MP: marcador de peso molecular *Page Ruler Prestained proteína Ladder* (Fermentas).

también se observó en las muestras de precipitado y eluatos antes y después de pasar por la columna el lisado celular, lo que indica que no ocurrió la completa solubilización de la proteína recombinante (Figura 25, carriles 2-4).

No obstante, en los carriles de los eluatos de la proteína purificada se observaron las banda con los pesos correspondientes a la CP de PMWaV-1, -2 y -3, purificada parcialmente (Figura 25, carriles 6-12, bandas marcadas). Este resultado sugiere la purificación parcial de la proteína, aunque también indica que se necesitan realizar ajustes posteriores del proceso para lograr un mayor recobrado de la proteína de interés.

V.2.7 Discusión final

V.2.7.1 La marchitez de la piña en Cuba ¿necesidad de un cambio en la perspectiva de su manejo?

El análisis de los resultados mostró una amplia presencia en todas las fincas prospectadas de plantas con síntomas de la MWP, así como de los virus diagnosticados que forman parte del complejo asociado a la enfermedad, tanto en infecciones simples como mixtas. Se encontraron altos valores de incidencia de plantas con MWP en las fincas prospectadas, y la presencia exclusiva de la cochinilla rosada (*D. brevipes*), vector de la enfermedad. Este hecho, tomando en cuenta además (*i*) la multiplicación vegetativa que se emplea para propagar la piña, (*ii*) las escasas atenciones culturales y (*iii*) el poco o ningún uso de control químico de los insectos vectores, indican el alto riesgo que representa la MWP en el país.

Los resultados derivados de este estudio enriquecen el modelo epidemiológico del patosistema de la enfermedad MWP. Particularmente en una plantación en Cuba, el complejo viral asociado a la MWP es diseminado por las cochinillas rosadas (*D. brevipes*) (Figura 26 A). En otros países, las grises (*D. neobrevipes*) y potencialmente, *Planococcus citri*, también diseminan los virus en las plantaciones (Sether *et al*., 1998; Gambley *et al*., 2008a).

En este estudio se detectó la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV en Cuba, y de ellos, PMWaV-2 fue la especie asociada con los síntomas (Figura 26 A). Esto es un aporte importante debido a la dicotomía en cuanto a la asociación de PMWaV-2 (Sether y Hu, 2002a), o PMWaV-1 y PMWaV-3 (Gambley *et al*., 2008a), en los estudios de Hawái y Australia, respectivamente. Al igual que en Australia y Hawái, en esta investigación tampoco se encontró un efecto significativo entre la presencia de PBCOV y la MWP (Figura 26 A). Gambley y Thomas (2015) plantearon la necesidad de explorar nuevas evidencias que permitan definir la etilogía de la MWP, y no se ha descartado un efecto de interacción ampelovirus – badnavirus.

En particular en cuanto a la función de los badnavirus, debe tenerse en cuenta otras enfermedades asociadas a caulimovirus como el complejo del tungro del arroz. Los síntomas de la enfermedad se acentúan en las co-infecciones de *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV, *Caulimoviridae*: *Tungrovirus*) con *Rice tungro spherical virus* (RTSV, *Secoviridae*: *Waikavirus*) (RSTV). Se demostró que RSTV incrementa la eficiencia de transmisión de RTBV por los saltahojas verdes (*Nephotettix virescens*, *N. cincticeps* y *Resilia dorsalis*) (Borah *et al*., 2013; Kumar y Dasgupta, 2017).

El material de propagación vegetativo extraído de la plantación adulta, disemina los virus y vectores a las nuevas plantaciones que se formarán con estos propágulos (Figura 26 B). Por ello, las altas incidencias encontradas en más de la mitad de las plantaciones visitadas, indican que existe un alto riesgo de diseminación de los virus mediante esta vía en Cuba. Otras vías de

diseminación pueden ser el movimiento de cochinillas virulíferas o su dispersión por las hormigas, a las nuevas plantaciones colindantes con las adultas (Figura 26 C).

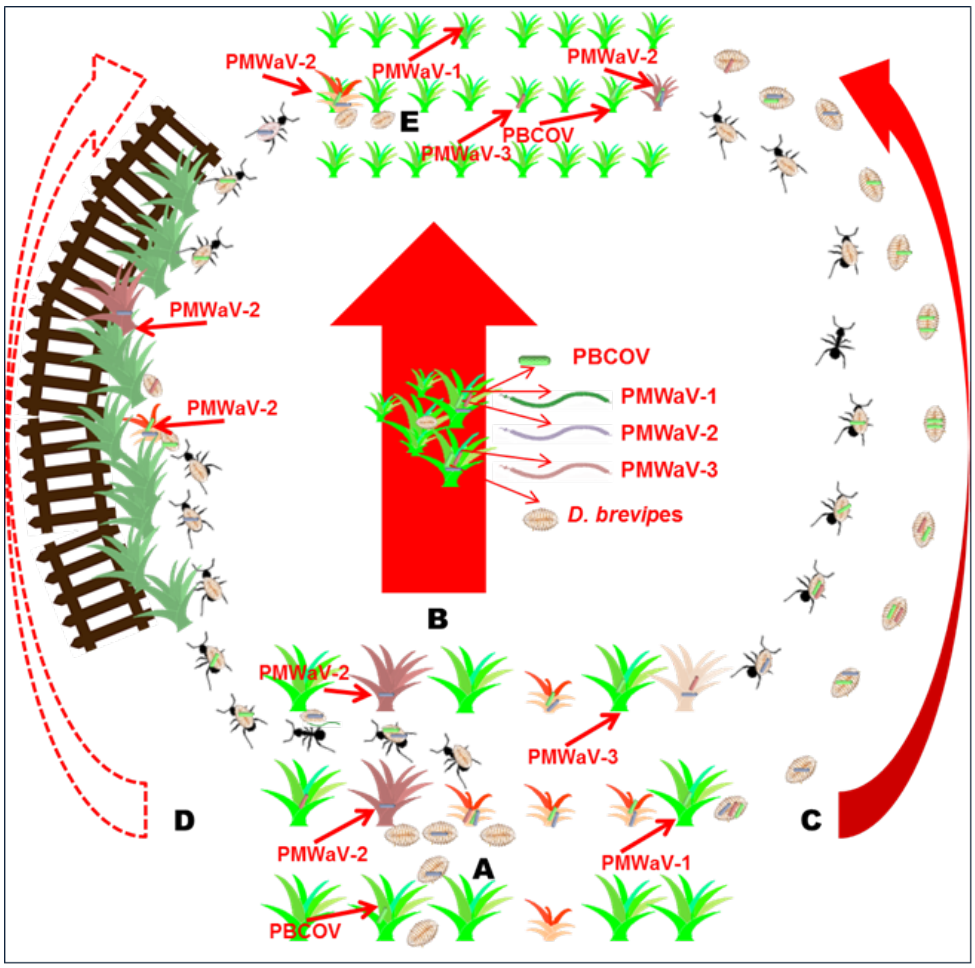


Figura 26. Esquema teórico del modelo epidemiológico del patosistema de la enfermedad marchitez de la piña (MWP) integrado con los resultados de esta investigación. En una plantación adulta, el complejo viral (PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV) asociado a la MWP es diseminado dentro del área por las cochinillas rosadas (*D. brevipes*, único encontrado en las áreas prospectadas durante este estudio) (**A**). En este estudio se detectó la presencia de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV en Cuba, y de ellos, PMWaV-2 fue la especie asociada con los síntomas (plantas rojas). El material de propagación vegetativo extraído de la plantación adulta, disemina los virus y vectores a las nuevas plantaciones que se formarán con estos propágulos (**B**). Otras vías alternativas pueden ser el movimiento de cochinillas virulíferas, o su dispersión por las hormigas, a las nuevas plantaciones colindantes con las adultas (**C**). Particularmente en Cuba, o países donde se utilice la bromelíacea *Bromelia pinguin* (piña ratón) como cerca viva, estas plantas pueden servir de hospedante alternativo y fuente de inóculo para nuevas plantaciones de piña que se establezcan en el área cercada con esta especie vegetal, resultado de esta investigación (**D**). En las nuevas plantaciones, las cochinillas diseminarán eventualmente los virus y así la enfermedad (**E**).

Un aporte notable de este trabajo al modelo epidemiológico de la MWP, para Cuba o países donde se utilice *B. pinguin* (piña ratón) como cerca viva, es que pueden servir de hospedante alternativo y fuente de inóculo para nuevas plantaciones colindantes (Figura 26 D). Los resultados de este estudio evidenciaron que al menos PMWaV-2, puede infectar las plantas de piña ratón. En las nuevas plantaciones, las cochinillas diseminarán los virus y la enfermedad (Figura 26 E).

La existencia de hospedantes alternativos es un factor determinante en la epifitiología de una enfermedad sistémica transmisible por insectos en plantas (Seabloom *et al*., 2015). La identificación de nichos alternativos es primordial puesto que las medidas de manejo se centran en la prevención, más que en la cura de la misma (Gergerich *et al*., 2015). Particularmente en Cuba, la prospección de hospedantes alternativos tiene una alta importancia dada la amplia distribución de la cochinilla rosada (*D. brevipes*) en una variada gama de especies vegetales (Martínez-Rivero *et al*., 2010).

En Cuba, la tecnología con que se establecen nuevas áreas de piña constituye el principal factor de diseminación de estos patógenos. Una medida imprescindible para disminuir la diseminación del complejo viral asociado a la MWP, es el uso de un programa para la producción de propágulos de piña certificados como libre de virus. Sin embargo, el establecimiento de una plantación de piña del híbrido 'MD-2' requiere entre 60 000 y 72 000 plantas/ha (López-Hernández y Domínguez-Martín, 2013), lo que implica la necesidad de un elevado número de propágulos a certificar y limita la factibilidad de este sistema.

Estos programas requieren el apoyo de herramientas de diagnóstico baratas, rápidas, sensibles y específicas (Dey *et al*., 2012). Los medios diagnósticos implementados en este trabajo pudieran constituir la base de los procedimientos de certificación del material de propagación. Sin embargo, la RT-PCR tiene un uso limitado en el procesamiento de altos volúmenes de muestras debido a su alto costo (López *et al*., 2009; Ramos-González *et al*., 2011). Otras metodologías basadas en inmunoensayos pudieran utilizarse para solucionar esta limitación, pero se necesitan los antígenos que permitan la obtención de anticuerpos específicos en la detección de estos agentes virales.

Una solución posible a este impedimento es el diseño de un Sistema de Producción de Material de Propagación de Piña Certificado (Figura 27), con diferentes niveles de cobertura en la certificación sanitaria, similar al establecido para el cultivo de los cítricos en Cuba (Zamora *et al*., 2016). Se establecería un Banco de Germoplasma, a partir de la propagación *in vitro* de material derivado de plantas madres diagnosticadas como libres de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV con los métodos desarrollados en este trabajo (Figura 27). Se deberán implementar metodologías para excluir la presencia de PMWaV-4 y PMWaV-5 y aplicar la PCR-Badnavirus para descartar la infección por otro badnavirus, como PBERV.

En este sentido, la tecnología de micropropagación es una herramienta eficaz que permite obtener gran número de plantas en poco tiempo y con mejor calidad (Rodríguez *et al*., 2012). Las vitroplantas producidas en Cuba mediante este procedimiento han mostrado un buen desarrollo en las plantaciones comerciales establecidas a partir de este material. Los frutos obtenidos en estas áreas cumplieron con todas las normas ténicas y de calidad descritas internacionalmente para la piña cv. 'MD-2' (Rodríguez *et al*., 2016).

A partir del material del Banco de Germoplasma, utilizando la propagación *in vitro* o la selección de hijos, en caso que se cuente con suficientes propágulos, se establecerían Bancos de Semilla Regionales (Figura 27). A partir de estas unidades, cuya función principal sería multiplicar el material del Banco de Germoplasma, se establecerían los Bancos de Semillas Locales, los cuales suministrarían el material, ya sea mediante la propagación *in vitro* o por hijos, para la formación de las plantaciones de piña.

Todas las unidades del sistema se someterían a prospecciones periódicas de su estado sanitario, teniendo en cuenta la certificación mediante observación visual del 100 % de las plantas. Además, se realizarán certificaciones mediante métodos de diagnóstico a un

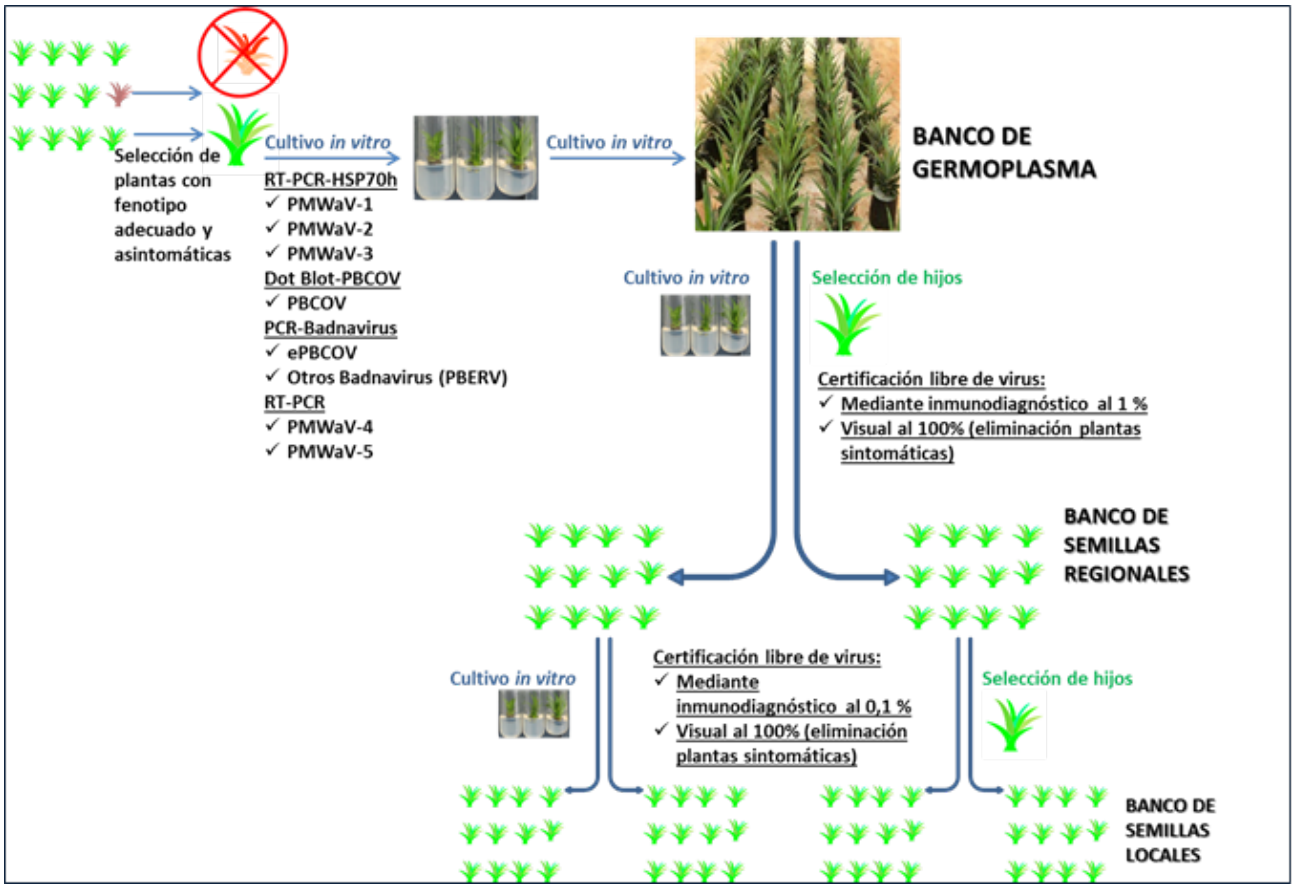


Figura 27. Propuesta de esquema de un Sistema de Producción de Material de Propagación Certificado de Piña. El sistema contendrá una unidad principal, denominada **Banco de Germoplasma**, en la cual se mantendrán accesiones caracterizadas morfoagronómicamente. Estas plantas se derivan de propagaciones mediante el cultivo *in vitro* de meristemos a partir de plantas seleccionadas en plantaciones con fenotipos adecuados según las características de cada cultivar y asintomáticas. A partir del Banco de Germoplasma, ya sea mediante la propagación *in vitro* o por hijos, se formarán los **Bancos de Semillas Regionales**, los cuales servirán de unidades sumistradoras de material de propagación ya sea por cultivo *in vitro* o por hijos, a los **Bancos de Semillas Locales**, que serán los que en cada localidad aporten el material de propagación para formar nuevas plantaciones.

porcentaje de las plantas que dependerá del nivel de la instalación en el sistema de producción. El Banco de Germoplasma deberá ser certificado en el 100 % de sus plantas, con una peridiocidad anual. Parte, los Bancos Regionales de Semillas se certificarán en un porcentaje del 1 %, y los Bancos Locales de Semillas al 0,1 %.

Además, estas áreas deberán establecerse bajo estrictos esquemas de control químico de insectos como cochinillas hormigas o cualquier otro que pudieran dañar la calidad de los propágulos. Los productores de piña tienen una baja aceptación de las plantas producidas *in vitro*, por lo que el esquema de producción debe incluir instalaciones para la propagación *in vitro* y para producción de hijos.

En su conjunto, la aplicación de este sistema contribuirá a limitar la diseminación del complejo viral asociado a la MWP, y de esta forma disminuir las pérdidas causadas por esta enfermedad. El estudio futuro de todas las variables que influyen en la epidemiología de la enfermedad, así como de los habitos de vida de las cochinillas y su interacción con las

hormigas en Cuba, también son resultados necesarios para la adecuación y el perfeccionamiento de las medidas de manejo que se implementen.

V.3 CONCLUSIONES

1. La marchitez de la piña, y la cochinilla rosada, único vector potencial encontrado, están ampliamente presentes en plantaciones comerciales de las tres regiones geográficas de Cuba, con incidencias que pueden alcanzar el 100 %, lo que evidencia el peligro que el patosistema en estudio representa para el desarrollo de este cultivo en el país.
2. La identificación de plantas con marchitez de la piña en Cuba en los cvs. 'Española roja', 'Cayena lisa' y 'MD-2' sólo es posible en estadios avanzados y requiere la presencia de necrosis y curvatura de las hojas hacia abajo, marchitez, agrupamiento heterogéneo de las plantas sintomáticas y enrojecimiento foliar, este último con la excepción del cv. 'MD-2'.
3. *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* (PMWaV-1) y PMWaV-3, constituyen nuevas especies de ampelovirus que infectan el cultivo de la piña en Cuba y en la Cuenca del Caribe.
4. La piña ratón (*B. pinguin*) es un hospedante natural alternativo de PMWaV-2 y puede representar un factor diseminador en la epidemiología del complejo “marchitez de la piña”-PMWaV-2-cochinilla en Cuba.
5. Se encontró por primera vez en plantas de piña de América el badnavirus *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV), así como de secuencias del elemento endogenous Pineapple bacilliform CO virus (ePBCOV).
6. El complejo viral asociado a la marchitez de la piña en las áreas prospectadas de las tres regiones geográficas de Cuba, esta compuesto por infecciones simples y mixtas de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV y de ellos PMWaV-2 es la especie viral que se asocia con los síntomas de la enfermedad.
7. El método de extracción de ácidos nucleicos evaluado (ph Bajo) produce una mezcla de ADN y ARN con calidad suficiente para los ensayos de detección de ampelovirus y badnavirus.
8. Las proteínas cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 purificadas pueden ser utilizadas para la obtención de inmunoreactivos específicos para la detección de los mismos.

V.4 RECOMENDACIONES

1. Ampliar la prospección para la búsqueda de PMWaV-4 y PMWaV-5, el badnavirus PBERV, identificados en plantas de piña en otras regiones del mundo, y confirmar la presencia o no de las cochinillas grises (*D. neobrevipes*), otro de los vectores potenciales de la MWP.
2. Realizar experimentos para completar la caracterización biológica de la patogenicidad de PMWaV-2 que permita afirmar que es el agente causal de la enfermedad en Cuba.
3. Implementar un sistema de producción de material de propagación certificado de piña, con la utilización de las herramientas de diagnóstico generadas por este trabajo con el objetivo de disminuir la diseminación de los agentes virales encontrados.

4. Efectuar un estudio epidemiológico para evaluar la diseminación espacio-temporal de la enfermedad marchitez de la piña en las plantaciones de Cuba que permita perfeccionar el manejo de la enfermedad en el país.

V.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, K., Martínez, Y., Zamora, L., Fernández, A., Santos-Cervantes, M. E., y Leyva-López, N. E., "PCR múltiple anidada para detección de fitoplasmas y rickettsia asociados con los síntomas del cogollo arrepollado (BTS) en papayo". Rev. Protección Veg. 26 (3): 156–163, 2011.
- Almeyda, C. V., Eid, S. G., Saar, D., Samuitiene, M., Pappu, H. R., "Comparative analysis of endogenous plant pararetroviruses in cultivated and wild *Dahlia* spp". Virus Genes. 48: 140–152, 2014.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., "Basic local alignment search tool". J. Mol. Biol. 215: 403–410, 1990.
- Alvarez, R. A., Martin, R. R., Quito-Avila, D. F., "First report of *Pineapple mealybug wilt associated virus*-1 in Ecuador". New Disease Reports. 31: 15, 2015.
- Awuah, R.T. y Adzim E., "Etiological and epidemiological studies on the red leaf disease of pineapple in Ghana". African Crop Science Journal. 12(2): 153–162, 2004.
- Bartholomew, D. P., "'MD-2' pineapple transforms the world's pineapple fresh fruit export industry". Pine. News. 16: 2–5, 2009.
- Bartholomew, D. P., Paul, R. E., y Rohrbach, K. G., "The pineapple: botany, production and uses". Editorial Commonwealth Agricultural Bureau, Intl., 320 pp., 2003.
- Bernad, L., Duran-Vila, N., 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. Mol. Cell. Probes 20: 105-113.
- Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J., Cambra, M., 2008. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. Eur J Plant Pathol 120:177–188.
- Blanco Rodríguez, E., Pérez Vicente, I. y Rodríguez Castro, Á. M., "Encuesta de los pseudocóccidos de Cuba. Resultados del período 2001-2002". Fitosanidad 7 (2): 31–36, 2003.
- Borah, B. K., Sharma, S., Kant, R., Johnson, M. A., Venkata, D. y Dasgupta I., "Bacilliform DNA-containing plant viruses in the tropics: commonalities within a genetically diverse group". Molecular Plant Pathology. 14(8): 759–771, 2013.
- Borroto, E. G., Cintra, M., Gonzalez, J., Borroto, C., y Oramas, P., "First Report of closterovirus-like particle associated with pineapple plants (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) affected with pineapple mealybug wilt in Cuba". Plant Dis. 82: 263, 1998.
- Borroto, E. G., Torres, J. A., y Laimer, M., "RT-PCR detection and protein-protein interaction of viral components of *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 2 in Cuba". J. Plant Pathol. 89(3): 435–439, 2007.
- Bousalem, M., Douzery, E. J. P., Seal, S. E., "Taxonomy, molecular phylogeny and evolution of plant reverse transcribing viruses (family *Caulimoviridae*) inferred from full-length genome and reverse transcriptase sequences". Arch. Virol. 153: 1085–1102, 2008.

- Bua, B., Karungi, J., y Geoffrey Kawube, G., "Occurrence and Effects of Pineapple Mealybug Wilt Disease in Central Uganda". Journal of Agricultural Science and Technology. A 3: 410–416, 2013.
- Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martinez, M. C., Cambra M., "Direct sample preparation methods for detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR". International Microbiology. 12: 1–6, 2009.
- Carnielli, L., Andrade, W., Vaz, A., Machado, P., Aires-Ventura, J., "Molecular diagnosis of *Fusarium guttiforme* and *Pineapple mealybug wilt-associated virus*". BMC Proceedings. 8 (Suppl 4):121, 2014.
- Carter, W., "Mealybug wilt of pineapple; a reappraisal". Annals of The New York Academy of Sciences. 105: 741–764, 1963.
- Chingandu, N., Kouakou, K., Aka, R., Gutierrez, O. A., Brown, J. K., "Unexpected Genome Variability at Multiple Loci Suggests Cacao Swollen Shoot Virus Comprises Multiple, Divergent Molecular Variants". J. Emerg. Virol. Dis. 3(1): 128, 2017.
- Colectivo de autores, "Boletín anual de estadística del Ministerio de la Agricultura de Cuba". Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 2016.
- Colectivo de autores, "Instructivo técnico para el cultivo de la piña". Editorial CIDA, La Habana, Cuba, 84 pp., 1989.
- Collazo, C., Núñez, J., Luis, M. y Llauger, R., "Optimización de una reacción en cadena de la polimerasa anidada para el diagnóstico de la enfermedad "huanglongbing" de los cítricos". CitriFrut. 28(2): 19–30, 2011.
- Couto, D., Stransfeld, L., Arruabarrena, A., Zipfel, C., Lozano-Durán, R., 2015. Broad application of a simple and affordable protocol for isolating plant RNA. BMC Res. Notes 8, 154.
- Crane, J. C., "Living fence posts in Cuba". Agriculture in America. 5(2): 34–35, 38, 1945.
- Dey, K. K., Borth, W. B., Melzer, M. J., Wang, M. L., y Hu, J. S., "Analysis of *Pineapple Mealybug Wilt Associated Virus* -1 and -2 for Potential RNA Silencing Suppressors and Pathogenicity Factors". Viruses. 7: 969–995, 2015.
- Dey, K. K., Lin, H., Borth, W. B., Melzer, M. J., y Hu, J. S., "A highly sensitive single-tube nested PCR assay for the detection of *Pineapple mealybug wilt associated virus*-2 (PMWaV-2)". Journal of Virological Methods. 183: 215–218, 2012.
- Dolja, V. V., Kreuze, J. F., Valkonen, J. P. T., "Comparative and functional genomics of closteroviruses". Virus Res. 117: 38–51, 2006.
- Dovas, C.I., Katis, N.I., Avgelis, A.D., 2002. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. Plant Dis. 86, 1345–1349.
- Eni, A. O., Hughes, J. d'A., Asiedu R., Rey, M. E. C., "Sequence diversity among badnavirus isolates infecting yam (*Dioscorea* spp.) in Ghana, Togo, Benin and Nigeria". Arch. Virol. 153: 2263–2272, 2008.

- FAO "Anuario de estadísticas de la Organización para la Agricultura y Alimentación (Food and Agricultural Organization)", 2014. http://faostat3.fao.org, accedido el 24 de septiembre de 2016.
- Fitter, A. H., y Hay, R. K. M., "Environmental Physiology of Plants". 2nd edition. Editorial Academic Press, London. 423 pp., 1987.
- Freitas-Ferreira, T., Moreira-Souza, R., dos Santos-Ferreira, K. D., y Silva-Idalino, W. S., "Interaction of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica* with mealybug wilt of pineapple, in microplots". Eur. J. Plant Pathol.: DOI 10.1007/s10658-014-0576-5, 2014.
- Gambley, C. F., Geering, A. D. W., Steele, V., y Thomas, J. E., "Identification of viral and non-viral reverse transcribing elements in pineapple (*Ananas comosus*), including members of two new badnavirus species". Arch. Virol. 153: 1599–1604, 2008b.
- Gambley, C. F., Geering, A. D. W., Thomas, J. E., "Development of an immunomagnetic capture-reverse transcriptase-PCR assay for three pineapple ampeloviruses". Journal of Virological Methods. 155:187–192, 2009.
- Gambley, C. F., Steele, V., Geering, A. D. W., Thomas, J. E., "The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with Mealybug wilt disease". Aust. Plant Pathol. 37: 95–105, 2008a.
- Gambley, C. y Thomas, J. "Mealybug Wilt Disease En: Virus Diseases of Tropical and Subtropical Crops". Editores: Tennant P. y Fermin G. Editorial CABI. Págs: 228–236, 2015.
- Geering, A. D. W y Hull R. "Family *Caulimoviridae*". En: Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Eds: King, A. M. Q., Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., Carstens, E. B. Editorial Academic Press, San Diego, CA, USA. Págs. 429–443, 2012.
- Geering, A. D. W., L. A. McMichael, R. G. Dietzgen y J. E. Thomas (2000): Genetic diversity among *Banana streak virus* isolates from Australia. Phytopathology 90: 921–927.
- Geering, A. D. W., Olszewski, N. E., Harper, G., Lockhart, B. E. L., Hull, R., y Thomas, J. E., "Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses". J. Gen. Virol. 86: 511–520, 2005a.
- Geering, A. D. W., Pooggin, M. M., Olszewski, N. E., Lockhart, B. E. L., y Thomas, J. E., "Characterisation of *Banana streak Mysore virus* and evidence that its DNA is integrated in the B genome of cultivated *Musa*". Arch. Virol. 150: 787–796, 2005b.
- Gergerich, R. C., Welliver, R. A., Gettys, S., Osterbauer, N. K., Kamenidou, S., Martin, R. R., Golino, D. A., Eastwell, K., Fuchs, M., Vidalakis, G., Tzanetakis, I. E., "Safeguarding fruit crops in the age of agricultural globalization". Plant Disease. 99 (2): 176–187, 2015.
- Gibbs, A. J. "Viral nomenclature, where next". Arch. Virol. 148(8): 1645–1653, 2003.
- Gottwald, T. R. "Survey strategies for CTV and BCA". En: Proceedings of the Third International Workshop Citrus Tristeza Virus and the Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: Management Strategies, May 1995. Editores Lee, R.F., *et al*. (eds.)., Lake Alfred, Florida. Págs: 32–39, 1995.

- Gunasinghe, U. B., y German, T. L., "Purification and partial characterization of a virus from pineapple". Phytopathology. 79: 1337–1341, 1989.
- Hanahan, D., "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". J. Mol. Biol. 166(4): 557–580, 1983.
- Hansen, C., y Heslop-Harrison, J. S., "Sequences and phylogenies of plant pararetroviruses, viruses and transposable elements". Advances in botanical research 41: 165–193, 2004.
- Harper, S.J., Cowell, S.J., Dawson, W.O., "Finding balance: Virus populations reach equilibrium during the infection process". Virology. 485: 205–212, 2015.
- He, Y. B., Zhan, R. L., Sun, G. M., Wu J. B., y Zhao, Y. L., "Phylogeography of pink pineapple mealybugs, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) reveals the history of pineapple introduction and cultivation in China". Genetics and Molecular Research. 14 (3): 9890–9897, 2015.
- Houndédji, C. D., Zandjanakou-Tachin, M., Affokpon, A., Bokonon-Ganta, A. H., "Prevalence De La Maladie Du Deperissement De L'ananas (Wilt) Et Perception Des Producteurs Au Benin". European Scientific Journal. 12(33): 350–369, 2016.
- Hu, J. S., Barry, K., Borth, W., Sether, D., Wu, Z. C., y Wang, M., "Detections of plant viruses in Haváii. En: Proceedings Haváii Agriculture: Positioning for Growth. Haváii Farm Bureau Federation and the College of Tropical Agriculture and Human Resources, Honolulu, 102, 1995.
- Hu, J. S., Sether, D. M., Liu, X. P., Wang, M., Zee, F., y Ullman, D. E., "Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple closterovirus in Hawaii". Plant Dis. 81: 1150–1154, 1997.
- Hughes, G., y Samita, S., "Analysis of Patterns of Pineapple Mealybug Wilt Disease in Sri Lanka". Plant Dis. 82(8): 885–890, 1998.
- Hull, R., "Comparative Plant Virology". 2nd Edition. Editorial Elsevier Academic Press. Burlington, MA, EE.UU. 362 páginas, 2009.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) "Virus Taxonomy: 2014 Release". Disponible: http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp (accedido el 9 de febrero de 2017), 2014.
- Iglesias, N.G., Gago-Zachert, S.P., Robledo, G., Costa, N., Plata, M.I., Vera, O., Grau, O., Semorile, L.C., 2008. Population structure of Citrus tristeza virus from field Argentinean isolates. Virus Genes 36:199–207.
- Ishwara-Bhat, A., Hohn, T., y Selvarajan R., "Badnaviruses: The Current Global Scenario". Viruses. 8: 177, 2016.
- Isidrón, M., Rosales, Y., Pifferrer, A., Cisneros, A., Benega, R., Carvajal, C., "Caracterización del germoplasma de piña colectado en Cuba mediante prospección nacional: I. Localización, diversidad genética y situación actual". Cultivos tropicales. 24(1): 65–71, 2003.
- Islam, W., "Management of plant virus diseases; farmer's knowledge and our suggestions". Hosts and Viruses. 4(2): 28–33, 2017.

- Islam, W., Zaynab, M., Qasim, M., y Wu, Z., "Plant-Virus Interactions: Disease Resistance in Focus". Hosts and Viruses. 4(1): 5–20, 2017.
- Jahn, G. C., Beardsley, J. W., y González-Hernández H., "A Review of the Association of Ants with Mealybug Wilt Disease of Pineapple". Proc. Hawaiian Entomol. Soc. 36: 9–28, 2003.
- Karasev, A. V., "Genetic diversity and evolution of closteroviruses". Annu. Rev. Phytopathol. 38:293–324, 2000.
- Kogel, K. H.; Franken, P.; Huckelhoven, R. Endophyte or parasite–what decides?. Current opinion in plant biology, London, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.
- Kumar, G. y Dasgupta, I., "Molecular biology or rice tungro viruses and strategies for their control". En: Biotic stress management in rice. Editores: Shamim, Md., Singh, K. N. Editora: Apple Academic Press. Oakville, ON, Canadá. Págs: 1–15, 2017.
- Llauger, R., Farres, E., Placeres, J., Peña, O., Alonso, M., Betancourt, M., García, M. E., Correa, A., Rodríguez, G., Pérez, J., "Proyección estratégica para la producción de los frutales en Cuba". CitriFrut. 26(1): 3–5, 2009.
- López, M. M., Llop, P., Olmos, A., Marco-Noales, E., Cambra, M., y Bertolini, E., "Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses?" Curr. Issues Mol. Biol. 11(1): 13–46, 2009.
- López, M.M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M.T., Llop, P., Penyalver, R., Cambra, M., 2003. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. Int Microbiol 6: 233–243.
- López, M.M., Llop, P., Olmos, A., Marco-Noales, E., Cambra, M. Bertolini, E., 2009. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? Curr. Issues Mol. Biol. 11(1): 13-46.
- López-Hernández, D., y Domínguez-Martín, Q., "El cultivo de la piña 'Cayena lisa' y sus selecciones en Cuba". CitriFrut 30(1): 62–66, 2013.
- Maliogka, V. I., Dovas, C. I., Katisa, N. I., "Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the Ampelovirus genus". Virus Research. 135: 125–135, 2008.
- Marie, F. "Pineapple pest and diseases in the Lesser Antilles. Survey results and recommendations". Editora IICA September, 1995.
- Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R. H. A., Dolja, V. V., Hu, J. S., Jelkmann, W., Karasev, A. V., Martin, R. R., Minafra, A., Namba, S., Vetten H. J. "Family *Closteroviridae*". En: Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Editores: King, A. M. Q., Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., Carstens, E. B. Editora Academic Press: San Diego, CA, USA. Págs. 987–1001, 2012a.
- Martelli, G. P., Ghanem-Sabanadzovic, N. A., Agranovsky, A. A., Al Rwahnih, M., Dolja, V. V., Dovas, C. I., Fuchs, M., Gugerli, P., Hu, J. S., Jelkmann, W., Katis, N. I., Maliogka, V. I., Melzer, M. J., Menzel, W., Minafra, A., Rott, M. E., Rowhani, A., Sabanadzovic, S., y

Saldarelli, P., "Taxonomic revision of the family *Closteroviridae* with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus *Ampelovirus* and the putative species unassigned to the family". J. Plant Pathol. 94(1): 7–19, 2012b.

- Martínez, M. A., Blanco. E. y Surís, M., "Fauna de chinches harinosas (Hemiptera: *Pseudococcidae*) asociadas a plantas de interés: iv plantas ornamentales". Rev. Protección Veg. 23 (1): 48–53, 2008.
- Martínez-Rivero, M. A., Ceballos Vázquez, M., Blanco Rodríguez, E., "Cochinillas Harinosas de Cuba". Editor: Martínez-Rivero, M. A. Editora CENSA. Págs. 228, 2010.
- Massart, S., Brostaux, Y., Barbossa, L., Batlle, A., Cesar, V., Ductrecq, O., Fonseca, F., Guillem, R., Komorowska, B., Olmos, A., Steyer, S., Wetzel, T., Kummert, J., y Jijakli, M. H., "Interlaboratory evaluation of two reverse-transcriptase polymeric chain reaction-based methods for detection of four fruit tree viruses". Ann. Appl. Biol. 154: 133–141, 2009.
- Melzer, M. J., Karasev, A. V., Sether, D. M., y Hu J. S., "Nucleotide sequence, genome organization, and phylogenetic analysis of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-2". J. Gen. Virol. 82: 1–7, 2001.
- Melzer, M. J., Sether, D. M., Karasev, A. V., Borth, W., y Hu, J. S., "Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1". Arch. Virology. 153: 707–714, 2008
- Murray, M. G., Thompson, W. F., "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA". Nucleic acids Res. 8: 4321–4325, 1980.
- Mur-Rodríguez, R. A., Granda-Sánchez, R. S., Castillo-Valdés, D., "Diagnóstico del comportamiento de *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) en el cultivo de piña (*Ananas comosus*) (L) Merr), híbrido MD-2 en la provincia Ciego de Ávila, Cuba". Rev. Protección Veg. 30 (Número Especial diciembre): 144, 2015.
- Nieves, N., Gaskin, R., Borroto, E., Gonzalez, J. L., Blanco, M., Gonzáles, A., y Quiñones, J., "El wilt de la piña: Cambios metabólicos inducidos en 'Cayena lisa'". Revista Brasileira de Fruticultura. 18: 245–254, 1996.
- Ochoa-Martínez, D. L., Uriza-Avila, D. E., Rojas-Martínez, R. I., Rodríguez-Martínez, D., "Detection of *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 1 and 3 in Mexico". Revista Mexicana de Fitopatología 34: AC1-AC11. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1601-1, 2016.
- Olmos Castelló, A., Bertolini, E., y Cambra Alvarez, M., "Validación de métodos de detección y diagnóstico de patógenos y costes de la especificidad y sensibilidad". Boletín de la SEF (63): 7–11. ISSN: 1998-513X, 2008.
- Oñate-Sánchez, L., Vicente-Carbajosa, J., 2008. DNA-free RNA isolation protocols for Arabidopsis thaliana, including seeds and siliques. BMC Res. Notes 1, 93.
- Pappua, H. R., Jones, R. A. C., Jain, R. K., "Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead". Virus Research. 141:219–236, 2009.
- Paull, R. E., Duarte, O., "Tropical Fruits". Ed. CAB International, 2nd Ed., (1). Págs: 327–365, 2011.

- Pérez, E. P., Sether, D. M., Melzer, M. J., Busto, J. L., Nagai, C., Hu, J. S., "Characterization and control of pineapple mealybug wilt associated ampeloviruses". ISHS Acta Horticulturae 702: Proc. Vth Intl. Pineapple Symp. Editor P.H. Joubert, 2006.
- Py, C., Lacoeuilhe, J. J., y Teisson, C., "The pineapple, cultivation and uses". Editora G.-P. Maisonneuve and Larose, Paris. 570 págs, 1987.
- Ramos-González, P. L., Hernández-Rodríguez, L., Banguela-Castillo, A., "Plataformas genéricas para el diagnóstico a gran escala en fitopatología". CitriFrut. 28(1): 25–27, 2011.
- Ramos-González, P.R., Hernández-Rodríguez, L., Banguela-Castillo, A., 2011. Plataformas genéricas para el diagnóstico a gran escala en fitopatología [Generic platforms for high-throughput diagnosis in phytopathology]. CitriFrut 28 (1): 25-27.
- Rodríguez, R., Becquer, R., Pino, Y., López, D., Rodríguez, R. C., Lorente González, G. Y., Izquierdo, R. E., González, J. E., "Producción de frutos de piña (Ananas comosus (L.) Merr.) MD-2 a partir de vitroplantas". Cultivos Tropicales. 37: 40–48, 2016.
- Rodríguez, R., Villalobo, A., Pino, Y., Concepción, O., Martínez, E., González, J y Santos, R., "Rapid Introduction of 'MD-2' Pineapple Using Micropropagation". Newsletter of the Pineapple Working Group, International Society for Horticultural Science. 19: 24, 2012.
- Rohrbach, K., y Johnson, M., "Pest, diseases and weeds". En The Pineapple Botany, Production and Uses. Editores: Bartholomew, D., Paull, R. E., Rohrbach K. G. Vol. 301. Wallingford: Editora CABI, págs: 503–509, 2003.
- Rouffiange, N., "Diagnosis of the pineapple industry in Guyana: major constraints and perspective". Editora IICA, September, 1993.
- Roy, A., Fayad, A., Barthe, G., Brlansky, R.H., 2005. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. J. Virol. Methods 129: 47–55.
- Rubio, L., Ayllón, M.A., Kong, P., Fernández, A., Polek, M., Guerri, J., Moreno, P., Falk, B.W., 2001. Genetic Variation of Citrus Tristeza Virus Isolates from California and Spain: Evidence for Mixed Infections and Recombination. J.Virol. 75 (17): 8054–8062.
- Rubio, L., Guerri, J., y Moreno, P. "Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*". Front. Microbiol. 4:151. doi: 10.3389/fmicb.2013.00151, 2013.
- Sambade, A., López, C., Rubio, L., Flores, R., Guerri, J., Moreno, P., 2003. Polymorphism of a specific region in gene p23 of Citrus tristeza virus allows discrimination between mild and severe isolates. Arch. Virol. 148 (12): 2325-2340.
- Sambrook, J., E. F. Fitsch, T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Editora Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press, 1989.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. In molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, pp 931-937.
- Santos, K. C., Andrade, E. C., Souza F. V. D., y Carvalho H. L., "Incidência e prevalência do pineapple mealybug wilt associated vírus em germoplasma de abacaxi". Tropical Plant Pathology (supplement) 36, 782. Proceedings of the XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Bento Gonçalves (RS), Brazil, 2011.

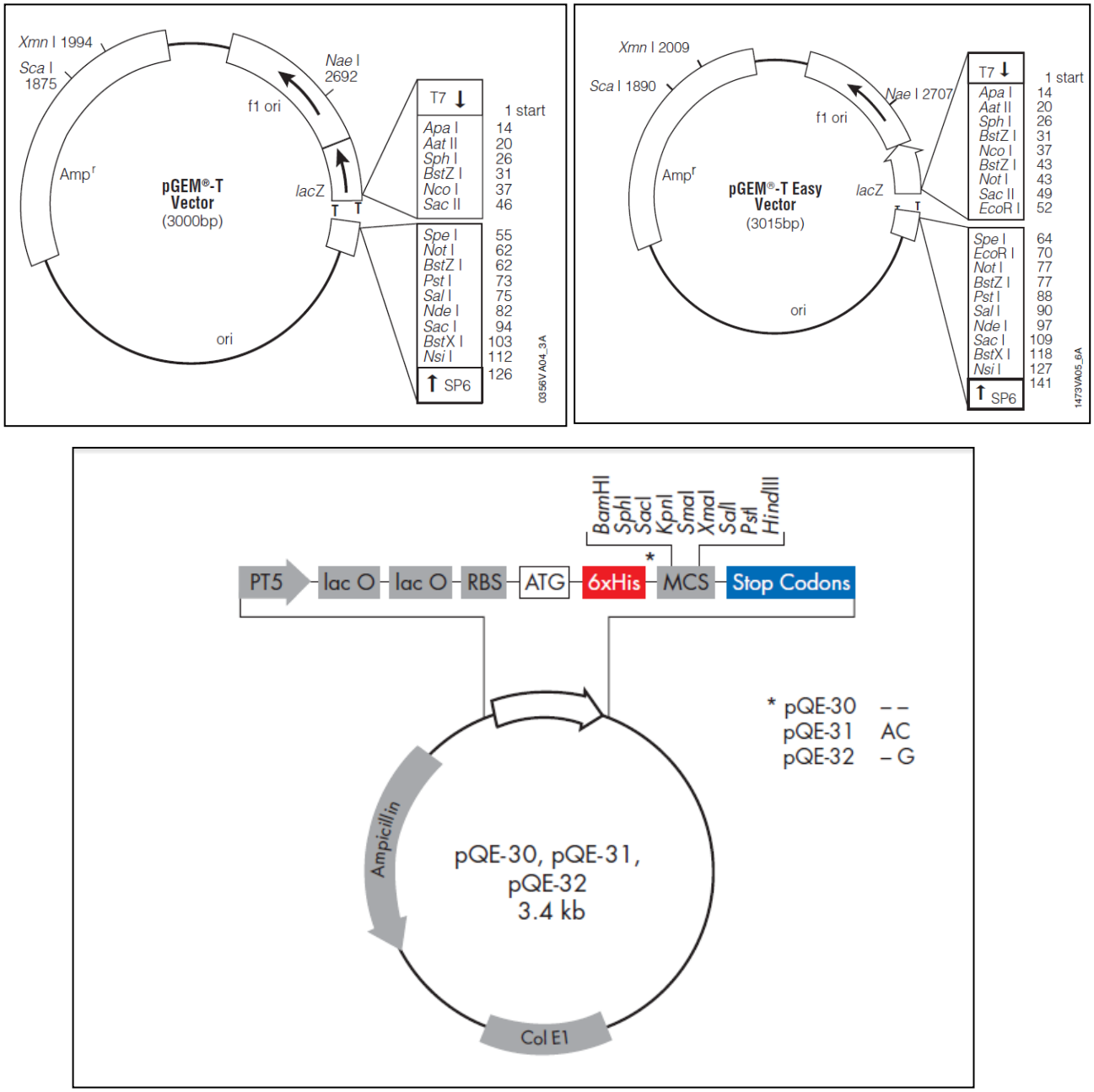
- Sastry, K. S. M., y Singh, S. J. "Wilt of pineapple. A new virus disease in India". Indian Phytopathol. 27: 298–303, 1974.
- Saunders, N., Zambon, M., Sharp, I., Siddiqui, R., Bermingham, A., Ellis, J., Vipond, B., Sails, A., Moran-Giladd, J., Marshe, P., Guiverf, M., "Guidance on the development and validation of diagnostic tests that depend on nucleic acid amplification and detection". Journal of Clinical Virology 56: 260–270, 2013.
- Seabloom, E. W., Borer, E. T., Gross, K., Kendig, A. E., Lacroix, C., Mitchell, C. E., Mordecai, E. A., y Power, A. G., "The community ecology of pathogens: coinfection, coexistence and community composition". Ecology Letters. Págs: 13. doi: 10.1111/ele.12418, 2015.
- Sether, D. M., Borth, W. B., Melzer, M. J., y Hu, J. S., "Spatial and Temporal Incidences of Pineapple mealybug wilt-associated viruses in Pineapple Planting Blocks". Plant Dis. 94(2): 196–200, 2010.
- Sether, D. M., Karasev, A. V., Okumura, C., Arakawa, C., Zee, F., Kislan, M. M., Busto, J. L., y Hu, J. S., "Differentiation, distribution, and elimination of two different Pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple". Plant Dis. 85: 856–864, 2001b.
- Sether, D. M., Melzer, M. J., Borth, W. B., y Hu, J. S., "Genome organization phylogenetic relationship of *Pineapple mealibug wilt associated virus*-3 with family *Closteroviridae*". Virus Genes. 38:414–420, 2009.
- Sether, D. M., Melzer, M. J., Borth, W. B., y Hu, J. S., "*Pineapple bacilliform CO virus*: diversity, detection, distribution, and transmission". Plant Dis. 96: 1798–1804, 2012.
- Sether, D. M., Melzer, M. J., Busto, J., Zee, F., y Hu, J. S., "Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple". Plant Dis. 89: 450–456, 2005a.
- Sether, D. M., Melzer, M. J., Subere, C. V., Hu, J. S., "*Pineapple mealybug wilt associated viruses* 1, 3, and 4 and *Grapevine leafroll associated viruses* 4, 5, 6 and 9 are a distinct group in the genus *Ampelovirus*". En: Libro de resúmenes del "XIII Congreso Internacional de Virología" ("XIII International Congress of Virology): págs. 121–122. Abstract V-68 Editora American Society for Microbiology, Washington, DC, 2005b.
- Sether, D. M., Ullman, D. E., y Hu, J. S., "Transmission of *Pineaple mealybug wilt-associated virus* by two species of mealybug (*Dysmicocus* spp.)". Phytopathology. 88: 1224–1230, 1998.
- Sether, D. M., y Hu, J. S., "Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease". Phytopathology. 92: 928–935, 2002a.
- Sether, D. M., y Hu, J. S., "The impact of pineapple mealybug wilt associated virus and reduced irrigation on pineapple yield. Australas. Plant Pathol. 30: 31–36, 2001a.
- Sether, D. M., y Hu, J. S., "Yield impact and spread of *Pineapple mealybug wilt associated virus*-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawaii". Plant Dis. 86: 867–874, 2002b.
- Shen, B. N., Zheng, Y. X., Chen, W. H., Chang, T. Y., Ku, H. M., y Jan, F. J., "Occurrence and Molecular Characterization of Three Pineapple Mealybug Wilt-Associated Viruses in Pineapple in Taiwan". Plant Dis. 93(2): 196, 2009.

- Singh, S. J., y Sastry, K. S. M., "Effect of different fertilizers and spacings on the incidence of pineapple wilt virus". Indian Journal of Mycology and Plant Pathology. 5: 156-160, 1975.
- Sipes, B. S., Sether, D. M., y Hu, J. S., "Interactions between *Rotylenchus reniformis* and *Pineapple mealybug wilt associated virus*-1 in pineapple". Plant Dis. 86: 933–938, 2002.
- Subere, C. V. Q., Sether, D. M., Borth, W. B., Melzer, M. J., y Hu, J.S., "Transmission characteristics of *Pineapple mealybug wilt associated virus*-2 by the grey pineapple mealybugs *Dysmicoccus neobrevipes* in Hawaii". In Proc. 7th International Pineapple Symposium. Eds: Abdullah et al., Acta Horticulturae 909. Págs: 393–399, 2011.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S., "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0". Molecular Biology and Evolution. 30: 2725–2729, 2013.
- Thomson, K. G., Dietzgen, R. G., Thomas, J. E., Teakle, D. S., "Detection of pineapple bacilliform virus using the polymerase chain reaction". Ann. Appl. Biol. 129: 57–69, 1996.
- Ullman, D. E., German, T. L., McIntosh, C. E., y Williams, D. D. F., "Effect of Heat treatment on a closteroviruslike particle associated with mealybug wilt of pineapple". Plant Dis. 75: 859–861, 1991.
- Vidal, E., Yokomi, R. K., Moreno, A., Bertolini, E., y Cambra, M. "Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of *Citrus tristeza virus*: A model for other plant pathogens". Phytopathology. 102: 114–121, 2012.
- Wakman, W., Teakle, D. S., Thomas, J. E., y Dietzgen, R. G., "Presence of a clostero-like virus and a bacilliform virus in pineapple plants in Australia". Aust. J. Agric. Res. 46: 947–958, 1995.
- Westgate, J., "Mealybug wilt of pineapples in South Florida". Proc. Fla. Sta. Hort. Soc. 58: 194–196, 1944.
- Wu, L., Ruan, X., Shen, W., Tan, Y., Zhai, G., y Li, H., "Sequencing and analysis of the complete genomic sequence of pineapple bacilliform comosus virus". Sci. Agric. Sin. doi:CNKI:SUN:ZNYK.0.2010-09-027, 2010.
- Wyatt, S.D., Brown, J.K., 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathol. 86, 1288–1293.
- Yadav, N., Khurana, S.M.P., 2016. Plant Virus Detection and Diagnosis: Progress and Challenges, in: Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology. Springer India, New Delhi, pp. 97–132.
- Yanes Paz, E., Gil, K., Rebolledo, L., Rebolledo, A., Uriza, D., Martínez, O., Isidrón, M., Díaz, L., Carlos Lorenzo, J. y Simpson, J., "Genetic diversity of Cuban pineapple germplasm assessed by AFLP Markers". Crop Breeding and Applied Biotechnology. 12: 104–110, 2012.
- Yang, I. C., Hafner, G. J., Revill, P. A., Dale, J. L., Harding, R. M., "Sequence diversity of South Pacific isolates of *Taro bacilliform virus* and the development of a PCR-based diagnostic test". Arch. Virol. 148: 1957–1968, 2003.

- Zamora Rodríguez, V., Peña Bárzaga, I., Hernández Rodríguez, L. y Cueto Rodríguez, J. R., "Producción de material de propagación certificado de cítricos". Citrifrut. 33 (2): 3–13, 2016.
- Zanella, C. M., Janke, A., Palma-Silva, C., Kaltchuk-Santos, E., Pinheiro, F. G., *et al*., "Genetics, evolution and conservation of *Bromeliaceae*". Genetics and Molecular Biology. 35 (4) (suppl): 1020–1026, 2012.
- Zhen, S., Kurth, E. G., Peremyslov, V. V., Zhou, C. Y., y Dolja, V. V., "Molecular characterization of a *Citrus yellow vein clearing virus* strain from China". Arch. Virol. 160: 1811–1813, 2015.
- Zheng, L., Rodoni, B.C., Gibbs, M.J., Gibbs, A.J., 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. Plant Pathol. 59, 211–220.
- Zhou, Y., Chen, H. M., Cao, M. J., Wang, X. F., Jin, X., Liu, K. H., y Zhou, C. Y., "Occurrence, Distribution, and Molecular Characterization of *Citrus yellow vein clearing virus* in China". Plant Disease 101: 137–143, 2017.

ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de los plasmidios pGEM®-T Vector, pGEM®-T Easy Vector (Promega) y pQE-30 (Qiagen).



Anexo 2. Número de accesión de las secuencias nucleotídicas de los virus utilizadas en los análisis filogenéticos de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 y miembros de la familia *Caulimoviridae* recuperadas de la base de datos GenBank.

Acrónimo	No. Acceso GB	Acrónimo	No. Acceso GB
AbYV	AY422070	PMWaV-1 HW	NC0101178 (genoma)
BYDV	EU191904	PMWaV-1 TL PJ3	EF620774 (*hsp70h*)
BYSV	U51931	PMWaV-1 TL 10	HE583225 (*hsp70h*)
BYV	AF190581	PMWaV-1 TL TK7	HG940514 (*hsp70h*)
CTV-T36	AY190468	PMWaV-1 TL CHP1-Swe	KT322147 (*hsp70h*)
CYLV	NC013007	PMWaV-1 TL PB1-Pbr	KT322163 (*hsp70h*)
GLRaV-1	AF195822	PMWaV-1 TW PT1	EU769113 (*hsp70h*)
GLRaV-2	EF012721	PMWaV-1 AU pPMW313	EF467923 (*hsp70h*)
GLRaV-3	EU259806	PMWaV-1 AU Pf553pmw10	EF467925 (*hsp70h*)
GLRaV-5	AF233934	PMWaV-1 CH	KJ872494 (genoma)
GLRaV-9	AY297819/AY072797	PMWaV-1 MX	KC800714 (*hsp70h*)
GLRaV-10	AM182328	PMWaV-2 HW	AF283103 (*hsp70h*)
GLRaV-11	AM494935	PMWaV-2 TL PJ3	EU016675 (*hsp70h*)
PBNSPaV	EF546442	PMWaV-2 TL 10	HE583226 (*hsp70h*)
SPCSV	DQ854356, DQ864364	PMWaV-2 TL Pra2	KT322169 (*hsp70h*)
ToCV	AY903448	PMWaV-2 TL KB	KT322168 (*hsp70h*)
		PMWaV-2 TW PT2	EU769115 (*hsp70h*)
		PMWaV-3 TW PJ3	FJ09047 (*hsp70h*)
		PMWaV-3 AU pB13P4P36	EF467918 (*hsp70h*)
		PMWaV-3 TL 10	HE583227 (*hsp70h*)
		PMWaV-3 MX	(parcial *hsp70h*)
		PMWaV-3 HW	DQ399259 (genoma)
		PMWaV-4	EU372003 (varios ORF)
		PMWaV-5	EF467920 (varios ORF)
		PMWaV-1 TL PT48-1	HE983617 (*cp*)
		PMWaV-1 TW PT1	EU769114 (*cp*)
		PMWaV-1 EC	KP728915 (*cp*)
		PMWaV-2 TW PT2	EU769116 (*cp*)
		PMWaV-2 CA CL	DQ225114 (*cp*)
		PMWaV-3 TW PJ3	FJ209048 (*cp*)
		HSP70 *Drosophila auraria*	AJ001365 (cromosoma)
		HSP70 *D. melanogaster*	AH007395 (cromosoma)

Anexo 3. Número de accesión de las secuencias nucleotídicas de los virus utilizadas en los análisis filogenéticos de los aislados de badnavirus y otros de la familia Caulimoviridae recuperadas de la base de datos GenBank.

Acrónimo	No. Acceso GB	Acrónimo	No. Acceso GB
AMt-1	EU522675	RTBV-G2	AF113831
BRRSV	NC003138	SCBMV	FJ824813
BSV CA	HQ593111	PBCOV-AU1 y AU2	EU377664, EU377666
CERV	NC003498	PBCOV-HW HI1	GQ398110
CaMV	NC001497	PBCOV-CH1 y CH2	NC_014648, GU121676
CsVMV	NC001648	PBERV AU	EU377673
ComYMV	X52938	PBV AU	Y12433
CyLNV	EU853709	PeVBV	GQ428155
CYMV	AF347695	PCSV	PCU13988
DraBV	DQ473478	TVCV	AF190123
ePPRV-1 AU	EU377674	Ty3/gypsy Monkey	AF143332
ePBCOV HW	GQ395780 al GQ395789	Ty3/gypsy RIRE3 OS	AB014738
KTSV	AY80137	Ty3/gypsy Ac_gypsy	ACY12432
RTBV	NC001914	Ty1/copia Tto1	D83003

Anexo 4. Cálculo y evaluación de los parámetros analíticos usados para la validación de técnicas de detección y/o diagnóstico

PARÁMETROS	DEFINICIÓN[a]	ECUACIÓN[b]
Verdaderos positivos, Vp	Plantas enfermas (sintomáticas) y positivas por el método de detección	-
Verdaderos negativos, Vn	Plantas sanas (asintomáticas) y negativas por el método de detección	-
Falsos positivos, Fp	Plantas sanas (asintomáticas) y positivas por el método de detección	-
Falsos negativos, Fn	Plantas enfermas (sintomáticas) y negativas por el método de detección	-
N	Tamaño de la población de muestras evaluada	Cantidad total de plantas diagnósticadas
Prevalencia de la enfermedad	Frecuencia con la que aparece la enfermedad en el total de la población (probabilidad de que una planta esté infectada y/o enferma)	(Vp+Fn)/N
Sensibilidad	Probabilidad de que el resultado de una prueba sea positiva en una planta infectada o enferma	Vp/(Vp+Fn)
Especificidad	Probabilidad de que el resultado de una prueba sea negativo en una planta sana	Vn/(Fp+Vn)
Valor predictivo positivo	Probabilidad de que una planta esté infectada o enferma habiendo dado el resultado de una prueba positivo	Vp/(Vp+Fp)
Valor predictivo negativo	Probabilidad de que una planta esté sana habiendo dado el resultado de una prueba negativo	Vn/(Vn+Fn)
Razón de verosimlitud positiva	Proporción de verdaderos positivos correctamente identificados por la técnica	1-especificidad=1-(Vn/(Fp+Vn))
Razón de verosimilitud negativa	Proporción de falsos negativos correctamente identificados por la técnica	Fn/especificidad
Probabilidad pre-test	Relación entre la probabilidad de enfermedad y la probabilidad de no enfermedad antes de realizar el test	Es igual a la prevalencia de la enfermedad
Probabilidad post-test	Probabilidad de que la muestra esté infectada y/o enferma después de llevar a cabo el test cualquiera sea su resultado	Razón de probabilidades post-test/(1+razón de probabilidades post-test), si: razón de probabilidades post-test=razón de probabilidades pre-test x razón de verosimilitud; y razón de probabilidades pre-test=prevalencia/(1-prevalencia)

[a] Según Olmos *et al*. (2008). [b] Según Capote *et al*. (2009).

Anexo 5. Información del estado sanitario y el diagnóstico de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 y PBCOV de las 144 muestras colectadas en las prospecciones.

ER: cv. 'Española roja', MD2: cv. 'MD-2', BP: *B. pinguin*, AA: *A. ananassoides*. El "0" indica ausencia del agente diagnósticado o del síntoma observado, y el "1", presencia.

Planta	Provincia	Nombre finca	cv.	RT-PCR-HSP70h PMWaV			Dot blot PBCOV	Síntomas					
				-1	-2	-3		Enrojecimiento hoja	Curvatura hoja	Necrosis hoja	Flacidez hoja	Marchitez	Enferma MWP
IJ1 ER-1	Isla de la Juventud	La Isabel 1	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
IJ1 ER-2		La Isabel 1	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
IJ1 ER-3		La Isabel 1	ER	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
IJ1 ER-4		La Isabel 1	ER	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
IJ2 ER-1		La Isabel 2	ER	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IJ2 ER-2		La Isabel 2	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
IJ2 ER-3		La Isabel 2	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
IJ2 ER-4		La Isabel 2	ER	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
IJ3 ER-1		La Isabel 3	ER	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
IJ3 ER-2		La Isabel 3	ER	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
IJ3 ER-3		La Isabel 3	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
IJ3 ER-4		La Isabel 3	ER	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
IJ3 ER-5		La Isabel 3	ER	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
IJ3 ER-6		La Isabel 3	ER	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
PR1 ER-1	Pinar del Río	Los Palacios 1	ER	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
PR1 ER-2		Los Palacios 1	ER	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
PR1 ER-3		Los Palacios 1	ER	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PR1 ER-4		Los Palacios 1	ER	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
PR2 ER-1		Los Palacios 2	ER	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
PR2 ER-2		Los Palacios 2	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
PR2 ER-3		Los Palacios 2	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
PR2 ER-4		Los Palacios 2	ER	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
PR2 ER-5		Los Palacios 2	ER	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
PR2 ER-6		Los Palacios 2	ER	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
PR2 ER-7		Los Palacios 2	ER	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
PR2 BP-1		Los Palacios 2	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
PR2 BP-2		Los Palacios 2	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
PR2 BP-3		Los Palacios 2	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
PR2 BP-4		Los Palacios 2	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
PR3 ER-1		Viñales	ER	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
PR3 ER-2		Viñales	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
PR3 ER-3		Viñales	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
PR3 ER-4		Viñales	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
PR3 ER-5		Viñales	ER	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1
PR3 ER-6		Viñales	ER	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1

Planta	Provincia	Nombre finca	cv.	RT-PCR-HSP70h PMWaV			Dot blot PBCOV	Síntomas					
				-1	-2	-3		Enrojecimiento hoja	Curvatura hoja	Necrosis hoja	Flacidez hoja	Marchitez	Enferma MWP
AR ER-1	Artemisa	Candelaria	ER	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AR ER-2		Candelaria	ER	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AR ER-3		Candelaria	ER	1	0	0	1	1	1	0	0	0	**1**
AR ER-4		Candelaria	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
AR ER-5		Candelaria	ER	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
AR ER-6		Candelaria	ER	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
LH ER-1	La Habana	Habana del Este 1	ER	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
LH ER-2		Habana del Este 1	ER	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
LH ER-3		Habana del Este 1	ER	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
LH ER-4		Habana del Este 1	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
LH ER-5		Habana del Este 1	ER	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
LH AA-1		Habana del Este 1	AA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LH AA-2		Habana del Este 1	AA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT1 ER-1	Matanzas	Los Arabos 1	ER	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
MT1 ER-2		Los Arabos 1	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
MT1 ER-3		Los Arabos 1	ER	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
MT1 ER-4		Los Arabos 1	ER	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
MT2 ER -1		Jagüey Grande	ER	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
MT2 ER -2		Jagüey Grande	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
MT2 ER -3		Jagüey Grande	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
MT2 ER -4		Jagüey Grande	ER	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
VC1 ER-1	Villa Clara	El Coronel	ER	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
VC1 ER-2		El Coronel	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
VC1 ER-3		El Coronel	ER	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
VC1 ER-4		El Coronel	ER	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
VC1 ER-5		El Coronel	ER	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
VC2 ER-1		La Esperanza	ER	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
VC2 ER-2		La Esperanza	ER	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
VC2 ER-3		La Esperanza	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
VC2 ER-4		La Esperanza	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
VC3 ER-1		Corralillo 2	ER	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
VC3 ER-2		Corralillo 2	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
VC3 ER-3		Corralillo 2	ER	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
VC3 ER-4		Corralillo 2	ER	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
VC4 ER-1		Corralillo 3	ER	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
VC4 ER-2		Corralillo 3	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
VC4 ER-3		Corralillo 3	ER	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
VC4 ER-4		Corralillo 3	ER	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
VC5 ER-1		La Fiti	ER	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
VC5 ER-2		La Fiti	ER	1	0	0	1	1	0	**1**	0	0	0
VC5 ER-3		La Fiti	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
VC5 ER-4		La Fiti	ER	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1

Planta	Provincia	Nombre finca	cv.	RT-PCR-HSP70h PMWaV			Dot blot PBCOV	Síntomas					
				-1	-2	-3		Enrojecimiento hoja	Curvatura hoja	Necrosis hoja	Flacidez hoja	Marchitez	Enferma MWP
CA MD2-1	Ciego de Ávila	UEB Frutales	MD2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
CA MD2-5		UEB Frutales	MD2	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0
CA MD2-3		UEB Frutales	MD2	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
CA MD2-11		UEB Frutales	MD2	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
CA MD2-12		UEB Frutales	MD2	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
CA MD2-7		UEB Frutales	MD2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
CA MD2-6		UEB Frutales	MD2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CA MD2-8		UEB Frutales	MD2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CA MD2-9		UEB Frutales	MD2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
CA MD2-10		UEB Frutales	MD2	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
CA MD2-4		UEB Frutales	MD2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CA MD2-2		UEB Frutales	MD2	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
CA MD2-13		UEB Frutales	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-14		UEB Frutales	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-15		UEB Frutales	MD2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
CA MD2-16		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA ER-17		Centro de Bioplantas	ER	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA ER-18		Centro de Bioplantas	ER	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-19		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-20		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-21		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-22		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-23		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-24	Ciego de Ávila	Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-25		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-26		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-27		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-28		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-29		Centro de Bioplantas	MD2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-30		Centro de Bioplantas	MD2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-31		Centro de Bioplantas	MD2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-32		Centro de Bioplantas	MD2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-33		Centro de Bioplantas	MD2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-34		Centro de Bioplantas	MD2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-35		Centro de Bioplantas	MD2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-36		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-37		Centro de Bioplantas	MD2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-38		Centro de Bioplantas	MD2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
CA MD2-39		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
CA MD2-40		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
CA MD2-41		Centro de Bioplantas	MD2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA BP-1		UEB Frutales	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
CA BP-2		UEB Frutales	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
CA BP-3		UEB Frutales	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1

Planta	Provincia	Nombre finca	cv.	RT-PCR-HSP70h PMWaV			Dot blot PBCOV	Síntomas					
				-1	-2	-3		Enrojecimiento hoja	Curvatura hoja	Necrosis hoja	Flacidez hoja	Marchitez	Enferma MWP
CA BP-4	Ciego de Ávila	UEB Frutales	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
CA AA-1	Ciego de Ávila	UEB Frutales	AA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CA AA-2		UEB Frutales	AA	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
CM1 ER-1	Camagüey	Güaimaro 1	ER	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
CM1 ER-2		Güaimaro 1	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
CM1 ER-3		Güaimaro 1	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
CM1 ER-4		Güaimaro 1	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
CM2 ER-1		Santa Cruz 1	ER	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
CM2 ER-2		Santa Cruz 1	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
CM2 ER-3		Santa Cruz 1	ER	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
CM2 ER-4		Santa Cruz 1	ER	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
CM3 ER-1		Santa Cruz 2	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
CM3 ER-2		Santa Cruz 2	ER	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
GR ER-1	Granma	San Vicente 1	ER	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
GR ER-2		San Vicente 1	ER	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
GR ER-3		San Vicente 1	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
GR ER-4		San Vicente 1	ER	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
HG BP-1	Holguín	Banes	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
HG BP-2		Banes	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
HG BP-3		Banes	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
HG BP-4		Banes	BP	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
SC1 ER-1	Santiago de Cuba	San Luis 1	ER	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
SC1 ER-2		San Luis 1	ER	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
SC1 ER-3		San Luis 1	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
SC1 ER-4		San Luis 1	ER	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
SC2 ER-1		San Luis 2	ER	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
SC2 ER-2		San Luis 2	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
SC2 ER-3		San Luis 2	ER	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
SC2 ER-4		San Luis 2	ER	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
SC2 ER-5		San Luis 2	ER	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
SC2 ER-6		San Luis 2	ER	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
GN1 ER-1	Guantánamo	Niceto Pérez 1	ER	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
GN1 ER-2		Niceto Pérez 1	ER	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
GN1 ER-3		Niceto Pérez 1	ER	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
GN1 ER-4		Niceto Pérez 1	ER	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
GN2 ER-1		Niceto Pérez 2	ER	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
GN2 ER-2		Niceto Pérez 2	ER	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
GN2 ER-3		Niceto Pérez 2	ER	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
GN2 ER-4		Niceto Pérez 2	ER	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1

Anexo 6. Secuencias nucleotídicas de los fragmentos del gen *hsp70h* de los aislados de PMWaV-1, -2 y -3 caracterizados durante este estudio

- PMWaV-1 CA MD2-4 (GB: HQ129930, 590 nt):

```
   1 acaggaagga caacactcac gccataggtt tgggggcact gttggaaaaa gacttagagg
  61 tttatcgtga tataaaaagg tatttcggac tcaacaagtt caacaaagat gtgtatctcg
 121 ataaattgaa acccacaatc gaggtagtga ttgacgactg gggttgttct ataggaccag
 181 tagacggtgc gagagggaaa gccaaatcag ttctcacttt agcctctgat tttataacgg
 241 gattggtaca actagcgatc aagatgacga atcaacaagt atctgtgtct gtttgttcag
 301 taccagcagc ttacaattct tatcaaagga gttttatttt tgaaagttgt aagttgagct
 361 ctataaatgt gcaggcggta gtaaacgaac cgaccgcagc tggattgagt gctttcataa
 421 ctaccccgaa agcttctgtg aattatttgt tagtctacga tttcggagga ggcacttttg
 481 atagttcctt actcgtggtt gggcctgcgt acgtgggagt actggattcg atgggagata
 541 actatctggg aggcagggac gtagataaca gattgcttga agtttgtgcg
```

- PMWaV-1 LH ER-1 (GB: JX645771, 590 nt):

```
   1 acaggaagga caacactcac gccataggtt tgggggcact gttggaaaaa gacttagagg
  61 cttatcgtga tataaaaagg tatttcggac tcaacaagtt caacaaagat gtgtatctcg
 121 ataaattgaa acccacaatc gaggtagtga ttgacgactg gggttgttct ataggaccag
 181 tagacggtgc gagagggaaa gccaaatcag ttctcacttt agcctctgat tttataacgg
 241 gattggtaca actagcgatc aagatgacga atcaacaagt atctgtgtct gtttgttcag
 301 taccagcagc ttacaattgt tatcaaagga gttttatttt tgaaagttgt aagttgagct
 361 ctataaatgt gcaggcggta gtaaacgaac cgaccgcagc tggattgagt gctttcataa
 421 ctaccccgaa agcttctgtg aattatttgt tagtctacga tttcggagga ggcacttttg
 481 atagttcctt actcgtggtt gggcctgcgt acgtgggagt actggattcg acgggagata
 541 actatctggg aggcagggac atagataaca gattgcttga agtttgtgcg
```

- PMWaV-2 IJ1 ER-2 (GB: FN825676, 610 nt):

```
   1 catacgaact agactcatac gtgctaaaat taaaaccagt gcacagagtg gaagtgttca
  61 aggacgggtc ggtaatgcta gggggtattg gtgaaggccc tgataggacg gtctctgtaa
 121 cggatatcat atccctttt tctaaagcac ttataaagga agcggaacag tctactggac
 181 tgcgcgtaac gggtgcggtg gtaacggtac tagccgacta caactctttt aaacgtagtt
 241 ttataactaa ctgcatgaaa gacttgggta ttccagtaag ggctatagta aatgaaccga
 301 ccgctgcagc gttatattct ttatctatat tacaagaaaa ggatttattt ctgtctgttt
 361 ttgactttgg tggagggacg tttgatgtgt cttttgttag aaaactcgga gatgtggtat
 421 gcgtactgtt tagcgttggt gataacttt taggggaag ggatatcgac agggcggtag
 481 cagctgaggt gaaggcaaga gtgggcgaat ctattgatac agctacattg tcattatttg
 541 cagcgtctat taaagaggag gtgactaatg agccgagggc aaagacgcac gtagtaaaat
 601 tggtggatgg
```

- PMWaV-2 LH ER-1 (GB: JX645772, 610 nt):

```
   1 catacgaact agactcatac gtgctaaaat taaaaccagt gcacagagtg gaagtgttca
  61 aggacgggtc ggtaatgcta gggggtattg gtgaaggccc tgataggacg gtctctgtaa
 121 cggatatcat atccctttt tctaaagcac ttataaagga agcggaacag tctactggac
 181 tacgcgtaac gggtgcggtg gtaacggtac agccgacta caactctttt aaacgtagtt
 241 ttataactat ctgcatgaaa gacttgggta ttccagtaag ggctatagta aatgaaccga
 301 ccgctgcagc gttatattct ttatctatat tacaagaaaa ggatttattt ctgtctgttt
 361 ttgactttgg tggagggacg tttgatgtgt cttttgttag aaaactcgga gatgtggtat
 421 gcgtactgtt tagcgttggc gataacttt taggggaag ggatatcgac agggcggtag
 481 cagctgaggt gaaggcaaga gtgggcgaat ctatcggtac agctacattg tcattatttg
 541 cagcgtctat taaagaggag gtaactaatg agccgagggc aaagacgcac gtagtaaaat
 601 tggtggatgg
```

- PMWaV-2 CA MD2-2 (GB: JX508637, 610 nt):

```
   1 catacgaact agactcatac gtgctaaaat taaaaccagt gcacagagtg gaagtgttca
```

```
 61 aggacgggtc ggtaatgcta gggggtattg gtgaaggccc tgataggacg gtctctgtaa
121 cggatatcat atccctttt tctaaagcac ttataaagga agcggaacag tctactggac
181 tacgcgtaac gggtgcggtg gtaacggtac cagccgacta caactctttt aaacgtagtt
241 ttataactaa ctgcatgaaa gacttgggta ttccagtaag ggctatagta aatgaaccga
301 ccgctgcagc gttatattct ttatctatat tacaagaaaa ggatttattt ctgtctgttt
361 ttgactttgg tggagggacg tttgatgtgt cttttgttag aaaactcgga gatgtggtat
421 gcgtactgtt tagcgttggc gataactttt taggggggaag ggatatcgac agggcggtag
481 cagctgaggt gaaggcaaga gtgggcgaat ctatcgatac agctacattg tcattatttg
541 cagcgtctat taaagaggag gtaactaatg agccgagggc aaagacgcac gtagtaaaat
601 tggtggatgg
```

- PMWaV-2 HG BP-3 (GB: JX645773, 610 nt):

```
  1 catacgaact agactcatac gtgctaaaat taaaaccagt gcacagagtg gaagtgttca
 61 aggacgggtc ggtaatgcta gggggtattg gtgaaggccc tgataggacg gtctctgtaa
121 cggatatcat atccctttt tctaaagcac ttataaagga agcggaacag tctactggac
181 tacgcgtaac gggtgcggtg gtaacggtac cagccgacta caactctttt aaacgtagtt
241 ttataactaa ctgcatgaaa gacttgggta ttccagtaag ggctatagta aatgaaccga
301 ccgctgcagc gttatattct ttatctatat tacaagaaaa ggatttattt ctgtctgttt
361 ttgactttgg tggagggacg tttgatgtgt cttttgttag aaaactcgga gacgtggtat
421 gcgtactgtt tagcgttggc gataactttt taggggggaag ggatatcgac agggcggtag
481 cagctgaggt gaaggcaaga gtgggcgaat ctatcgatac ggctgcattg tcattatttg
541 cagcgtctat taaagaggag gtaactaatg agccgagggc aaagacgcac gtagtaaaat
601 tggtggatgg
```

- PMWaV-3 IJ1 ER-2 (GB: GU563497, 500 nt):

```
  1 attgatggat gtgtatcgga aagcggtacg atatacgtac ccactgtcgt aggttacaga
 61 accgacggta ctttcgccat cggtttagga gcactactcg aacgtaactt aacagtttac
121 cgcgacatta aacggtattt cgggttgaac aaatttaaca aagatactta cacttcaaaa
181 ctcaaatcag aagtagaggt agtcgttgat gattggacgt gcaaaattgg tcccgttgat
241 gggtcaaaag gtaaggcacg atctgttatt gctctagcat cagattttgt gacaggtctt
301 tgtgctatag ctgttaaaat gacgggacaa ccggtgacgt tgtcggtgtg ttctgtacct
361 gcagcttaca actcttattt acgcagcttt atatatgaaa gttgtaaatt gagttcgata
421 aacgtacagg cggtggttaa tgaaccaact gcagcaggcc tcagtgcgtt tatagatatt
481 ccgaaatcta cagtgaacta
```

- PMWaV-3 CA MD2-2 (GB: JX508636, 500 nt):

```
  1 attgatggat gtgtatcgga aagcggtaca atatacgtac ccactgtcgt aggttacaga
 61 accgacggta ctttcgccat cggtttagga gcactactcg aacgtaactt aacagtttac
121 cgcgacatta aacggtattt cgggttgaac aaatttaaca aagatactta cacttcaaaa
181 ctcaaatcag aagtggaggt agtcgttgat gattggacgt gcaaaattgg tcccgttgat
241 ggatcaaaag gaaaggcacg atctgttatt gctctagcat cagattttgt gacaggtctt
301 tgtgctatag ctgttaaaat gacgggacaa ccggtgacgt tgtcggtgtg ttctgtacct
361 gcagcttata actcttattt acgcagcttt atatatgaaa gttgtaaatt gagttcgata
421 aacgtacagg cggtggttaa tgaaccaact gcagcaggtc tcagtgcgtt tatagaaatt
481 ccgaaatcta cagtgaacta
```

Anexo 7. Secuencias nucleotídicas del gen *cp* de los aislados de PMWaV-1, -2 y -3 caracterizados durante este estudio

- PMWaV-1 CA MD2-4 (GB: JN995531, 774 nt):

```
   1 atggctgatt cgagcaaaca aaaacaacct gaacatgctg actctgggcc taagacagtg
  61 gatgaccaag tcaaggaaat aatgaacctg cctgtgccgg gaggtagaac tactgtgtca
 121 acgtttgaag atttgatagc agctgaaaat gctataattg atttcaccaa ggttgatgta
 181 ccacgcatga ttaatgttcc gatcccagga atagttacta atgcacacaa ggtgatagga
 241 tccaaagctc tgtgggagtt gggtaaatcg aagggtatat cagaatcggc gaaacacatg
 301 atccaatttt tgatgcaatc tttccaagat atgtgcacct tttctacatc accgaaagtt
 361 tcggcgactc agaactactc taccacagct aagtatgatg gtaaagatgt taacgtcacg
 421 cacgaggaga tcagaattgc tttgagcaac tcactatcca atttgggata tgataatcct
 481 atgagacagt ttgggagagg ttttacttcc acaattgttc aaggactgag ttctgggaag
 541 ttggtggtta acactaggat atgtactaag aacggagtac cgaggaatta ttactcgttc
 601 tatccagatt gcttacacgt ggaagccaga gtacacggtg atgatgcagc gttggtaagt
 661 gagttagcca gaatggtagc cataaacaga gcaaactcga gtggttctgg cgaacacaac
 721 gtctttgaga agacggctgt gtccccgcac atctttatgg gtggacgcaa ataa
```

- PMWaV-1 LH ER-3 (GB: JN995532, 774 nt):

```
   1 atggctgatt cgagcaaaca aaaacaacct gaacatgctg actctgggcc taaggcagtg
  61 gatgaccaag tcaaggaaat aatgaacctg cctgtgccgg gaggtagaac tactgtgtca
 121 acgtttgaag atttgatagc agctgaaaat gctataattg atttcaccaa ggttgatgta
 181 ccacgcatga ttaatgttcc gatcccagga atagttacta atgcacacaa ggtgatagga
 241 tccaaagctc tgtgggagtt gggtaaatcg aagggtatat cagaatcggc gaaacacatg
 301 atccaatttt tgatgcaatc tttccaagat atgtgcacct tttctacatc accgaaagtt
 361 tcggcgactc agaactactc taccacagct aagtatgatg gtaaagatgt taacgtcacg
 421 cacgaggaga tcagaattgc tttgagcaac tcactatcca atttgggata tgataatcct
 481 atgagacagt ttgggagagg ttttacttcc acaattgttc aaggactgag ttctgggaag
 541 ttggtggtta acactaggat atgtactaag aacggagtac cgaggaatta ttactcgttc
 601 tatccagatt gcttacacgt ggaagccaga gtacacggtg atgatgcagc gttggtaagt
 661 gagttagcca gaatggtagc cataaacaga gcaaactcga gtggttctgg cgaacacaac
 721 gtctttgaga agacggctgt gtccccgcac atctttatgg gtggacgcaa ataa
```

- PMWaV-2 IJ1 ER-2 (GB: JN995533, 909 nt):

```
   1 atggctcaga attacgtagc cgcagtagaa ggcactattc tcgaaagttt gacggctcca
  61 cctaaacgat ttagagtggc gacgtctgat gtggggaaat attacgatag tagcaaatac
 121 cgctctgtaa cgggcgtagc tacagccgag agggatcggt taccagcgat agaggaaact
 181 gaactattgg caacaatccc aacggaagct tcaacagata agggtgttat tcctgagact
 241 gttaagaagt cgagtaataa accagaaata gtagatgatg tatcaacgtt gctgttaaat
 301 cctagaaaga acgttgtact aaatattgga tcggttaaaa ccgtgccaaa ggtagttaat
 361 cagccgggtt tgatatcccg ggagattgct atccgtatag gagaggctct gaaggaacat
 421 tgcaaacaag ttatgggttc ggatagtagt acggacttag ctacatactt tatacatttg
 481 atccaactcg ctattacgtt ttctacatca aaaaatagcg aatacaaaga gtttgactat
 541 atagaaacag agacgcaaaa gaaaatatac atcaaggacg tgagtgaggt ggttgagaga
 601 gcggcgatga attcggggta cgaaaacccg tttaggcaat atatgcgtta ttttacaagc
 661 tcgagtataa cactaacttt aaatggtaaa ataacaccta acgagagaac tatggctcat
 721 cacggagtac ccaagcagtt ctttgcatat acttacgatt ttattgaccc cgactatagc
 781 ctcatgaatc attcggcgat taatgcttac aacttagcga ggattcaagc atttaagaat
 841 aagatagctt cagtgaacaa tactatgcat aacacatacc agctgaacca gggagctgtt
 901 tcagggtag
```

- PMWaV-2 LH ER-1 (GB: JN995534, 909 nt):

```
   1 atggctcaga attacgtagc cgcagtagaa ggcactattc tcgaaagttt gacggctcca
  61 cctaaacgat ttagagtggc gacgtctgat gtggggaaat attacgatag tagcaaatac
 121 cgctctgtaa cgggcgtagc tacagccgag agggatcggt taccagcgat agaggaaact
```

```
181 gaactattgg caacaatccc aacggaagct tcaacagata aggacgttat tcctgagact
241 gttaagaagt cgagtaataa accagaaata gtagatgatg tatcaacgtt gctgttaaat
301 cctagaaaga acgttgtact aaatattgga tcggttaaaa ccgtaccaaa ggtagttaat
361 cagccgggtt tgatatcccg ggagattgct atccgtatag gagaggctct gaaggaacat
421 tgcaaacaag ttatgggttc ggatagtagt acggacttag ctacatactt tatacatttg
481 attcaactcg ctattacgtt ttctacatca aaaaatagcg aatacaaaga gtttgactat
541 atagaaacag agacgcaaaa gaaaatatac atcaaggacg tgagtgaggt ggttgagaga
601 gcggcgatga attcggggta cgaaaacccg tttaggcaat atatgcgtta ttttacaagc
661 tcgagtataa cactaacttt aaatggtaaa ataacaccta acgagagaac tatggctcat
721 cacggagtac ccaagcagtt ctttgcatat acttacgatt ttattgaccc cgactatagc
781 ctcatgaatc attcggcgat taatgcttac aacttagcga ggattcaagc atttaagaat
841 aagatagctt cagtgaacaa tactatgcat aacacatacc agctgaacca gggagctgtt
901 caagggtag
```

- PMWaV-2 CA MD2-2 (GB: JX645775, 909 nt):

```
  1 atggctcaga attacgtagc cgtagtagaa ggcactattc tcgaaagttt gacggctcca
 61 cctgaacgat ttagagtggc gacgtctgat gtggggaaat attacgatag tagcaaatac
121 cgctctgtaa cgggcgtagc tacagccgag agggatcggt taccagcgat agaggaaact
181 gaactattgg caacaatccc aacggaagct tcaacagata agggtgttat tcctgagact
241 gttaagaagt cgagtaataa accagaaata gtagatgatg tatcaacgtt gctgttaaat
301 cctagaaaga acgttgtact aaatattgga tcggttaaaa ccgtaccaaa ggtagttaat
361 cagccgggtt tgatatcccg ggagattgct atccgtatag gagaggctct gaaggaacat
421 tgcaaacaag ttatgggttc ggatagtagt acggacttag ctacatactt tatacatttg
481 attcaactcg ctattacgtt ttctacatca aaaaatagcg aatacaaaga gtttgactat
541 atagaaacag agacgcaaaa gaaaatatac atcaaggacg tgagtgaggt ggttgagaga
601 gcggcgatga attcggggta cgaaaacccg tttaggcaat atatgcgtta ttttacaggc
661 ttgagtataa cactaacttt aaatggtaaa ataacaccta acgagagaac tatggctcat
721 cacggagtac ccaagcagtt ctttgcatat acttacgatt ttattgaccc cgactatagc
781 ctcatgaatc attcggcgat taatgcttac aacttagcga ggattcaagc atttaagaat
841 aaggtagctt cagtgaacaa tactatgcat aacacatacc agctgaacca gggagctgtt
901 tcagggtag
```

- PMWaV-2 HG BP-3 (GB: JN995535, 909 nt):

```
  1 atggctcaga attacgtagc cgtagtagaa ggcactattc tcgaaagttt gacggctcca
 61 cctaaacgat ttagagtggc gacgtctgat gtggggaaat attacgatag tagcaaatac
121 cgctctgtaa cgggcgtagc tacagccgag aggggtcggt taccagcgat agaggaaact
181 gaactattgg caacaatccc aacggaagct tcaacagata agggtgttat tcctgagact
241 gttaagaagt cgagtaataa accagaaata gtagatgatg tatcaacgtt gctgttaaat
301 cctagaaaga acgttgtact aaatattgga tcggttaaaa ccgtgccaaa ggtagttaat
361 cagccgggtt tgatatcccg ggagattgct atccgtatag gagaggctct gaaggaacat
421 tgcaaacaag ttatgggttc ggatagtagt acggacttag ctacatactt tatacatttg
481 attcaactcg ctattacgtt ttctacatca aaaaatagcg aatacaaaga gtttgactat
541 atagaaacag agacgcaaaa gaaaatatac atcaaggacg tgagtgaggt ggttgagaga
601 gcggcgatga attcggggta cgaaaacccg tttaggcaat atatgcgtta ttctacaagc
661 tcgagtataa cactaacttt aaatggtaaa ataacaccta acgagagaac tatggctcat
721 cacggagtac ccaagcagtt ctttgcatat acttacgatt ttattgaccc cgactatagc
781 ctcatgaatc attcggcgat taatgcttac aacttagcga ggattcaagc atttaagaat
841 aagatagctt cagtgaacaa tactatgcat aacacatacc agctgaacca gggagctgtt
901 tcagggtag
```

- PMWaV-3 IJ1 ER-2 (GB: JN995536, 789 nt):

```
  1 atgagtacga ttccagtact acctcctccc tctgcaccat cgactccggt acaaccgcag
 61 ctgcccaaaa ctgatgagga acaattacag gagattgaaa atctgcctct acctggaggt
121 aggactacag tgaatacttt cactgatctg atatcgtcga ataatgcagt attggatttc
181 actaaagtgg aagtaccgcg gatgatcaac ataaccatac ctgggatagt ggcgaaagaa
241 catcgagtga agggagccaa agcattatgg gaactaggta aatctaaagg aatctctgaa
```

```
301 agcgacaaac acatgataca gtttctgatg cagagtttcc aaagtttcgt cactcattcg
361 acatcaccta aggtctcagg tgcttcgaac cgtacaataa ctgctaagta cgacaacaaa
421 gatgtaacgg tgtctcatga agagttaaag actactttag ataattcact agccagttac
481 ggctatgaaa ataccatgag acaatttggg agggctttca caactgcaat agttcagggt
541 ttaagttcgg gcaagatgga ggtaaatact cgaatttgct cttctcacgg tatacctcct
601 aactactatc cctactctcc agactgttta catgtagacg cacgcataca aggatatgat
661 gctgctttag caaacgagtt agggaagatg gtagcactta acaaaaacgc tgggggtaag
721 cgtacgcaac ataacttgtt tgaggagact gacatatctc ctcaaatatt tacaggtaat
781 cgcagatga
```

- PMWaV-3 CA MD2-2 (GB: JX645774, 789 nt):

```
  1 atgagtaaga ttccagtact acctcctccc tctgcaccat cgactccggt acaaccgcag
 61 ctacccaaag ctgatgagga acaattacag gagattgaaa atctgcctct acctggaggt
121 aggactacag tgaatacttt cactgatctg atatcgtcga ataatgcagt attggatttc
181 actaaagtgg gagtaccgcg gatgatcaac atcaccatac ctgggatagt ggcgaaagaa
241 catcgagtga agggagccaa agcattatgg gaactaggta agtctaaagg aatctctgaa
301 agtgacaaac acatgataca gtttctgatg cagagtttcc aaagtttcgt cactcattcg
361 acatcaccta aggtctcagg tgcttcgaac cgtacaataa ctgctaagta cgacaacaaa
421 gatgtaacgg tgtctcatga agagataaag actactttag ataattcact agccagttac
481 ggctatgaaa ataccatgag acaatttggg agggctttca caactgcaat agttcagggt
541 ttaagttcgg gcaagatgga ggtaaatact cgaatttgct cttctcacgg tatacctcct
601 aactactatc cctactctcc agactgctta catgtagacg cacgcataca aggatatgat
661 gccgctttag caaacgagtt agggaagatg gtagcactca acaaaaacgc tggaggtaag
721 cgtacgcaac ataacttgtt tgaggagact gacatatctc ctcaaatatt tacaggtaat
781 cgcagatga
```

Anexo 8. Secuencias nucleotídicas de los fragmentos génicos de la región RT/RNasaH de los retroelementos caracterizados durante este estudio

- PBCOV GR ER-1 (GB: JQ390618, 540 nt):

```
  1 gctgaaaaac gcaccagcag tattccaaag aaaaatggac cactgcttcc gaggcacgga
 61 agattttatt gctgtgtaca tcgatgatat tttagtcttt tcagacacag cagagcaaca
121 caaacatcat ctggagatct tcctccagat agtaaggaaa aatgggcttg ttctaagccc
181 aacaaaaatg aaggtgggcg tccagcaagt ggacttcttg ggtgcgacta ttggaaattc
241 acgcatccga ctccagcccc atatcattca aaaggtcgtc cagttcaatg acaaggacct
301 gcagacaaca aaagggctcc gaagtttctt gggcatactt aattatgcaa ggagctatat
361 accacagatg ggaaaactac ttggcccatt atattcaaag gtttcaccta caggagaaaa
421 gaaaatgaac aaacaagact gggctattgt agaaaagatc aaacaaaccg tggagcaact
481 accagaattg gagctccctc ctaatgggtc ggttattatc atcgaaactg atggatgtat
```

- PBCOV LH ER-4 (GB: JQ390619, 540 nt):

```
  1 gctgaaaaac gcaccagcag tatttcaaag aaagatggat cactgcttcc gaggcacgga
 61 agattttatc gctgtataca tcgatgacat tctagtcttt tcagacacag ctgaacagca
121 taagcatcat ctggagatct tcctccagat agtaaggaag aatgggcttg ttctaagccc
181 aacaaaaatg aaggtgggcg tccagcaagt ggacttcttg ggtgcgacta ttggaaattc
241 acgcatccga ctccagcccc atatcattca aaaggtcgtc cagttcaatg acaaggacct
301 gcagacaaca aaagggctcc gaagtttctt gggcgtactt aattatgcaa ggagctatat
361 accacagatg ggaaaactac ttggcccgtt gtattcaaag gtttcaccta caggagaaaa
421 gaaaatgaac aaacaagaca gggctattgt agaaaagatc aaacaaaccg tggagcaact
481 accagagttg gagctccctc ctaatgggtc ggttattatc atcgaaactg atggatgtat
```

- PBCOV GN1 ER-2 (GB: JQ390620, 540 nt):

```
  1 gctgaaaaac gcaccagcag tatttcagag aaaaatggac cactgcttcc gaggtacgga
 61 agattttatt gctgtgtaca tcgatgatat tttagtcttt tcagacacag cagagcaaca
121 caaacatcat ctggagatct tcctccagat agtaaggaag aatgggcttg ttctaagccc
181 aacaaaaatg aaggtgggcg tccagcaagt ggacttcttg ggcgcgacta ttggaaactc
241 gcgcatccga ctccagcccc acattattca aaaggtcgtc caatttaatg acaaggacct
301 acagacgaca aaagggctcc gaagtttctt aggcatacta aattatgcaa ggagctacat
361 accccaaatg ggaaaactac ttggcccatt atactccaag gtttcaccga caggagagaa
421 gaaaatgaac aaacaagatt gggctattgt agaaaagatc aagcagacgg tggagcaact
481 accagagttg gagctccctc ctaatgggtc ggttatcatc atagagaccg atgggtgcat
```

- PBCOV MT1 ER-2 (GB: JQ390621, 540 nt):

```
  1 gctgaaaaac gcaccagcag tatttcaaag aaaaatggac cattgcttcc gaggcacgga
 61 agattttatt gctgtgtaca tcgatgatat tttagtcttt tcagacacag cagagcaaca
121 caaacatcat ctggagatct tcctccagat agtaaggaag aatgggcttg ttctaagccc
181 aacaaaaatg aaagtgggcg tccaacaggt ggacttcttg ggtgcgacta ttggaaactc
241 gcgcatccga ctccagcccc acatcattca aaaggtcgtc caattcaatg acaaggacct
301 acaaacgaca aaagggctcc gaagtttctt aggcatactg aattatgcaa ggagctacat
361 accacaaatg ggaaaactac ttggcccatt atattcaaag gtttcaccga caggagaaaa
421 gaaaatgaac aaacaagatt gggctattgt ggagaaaatc aagcagacgg tggagcaact
481 acccgagttg gagctccctc ccaatggatc gattatcatc atagagacgg atggatgcat
```

- ePBCOV CA MD2-15 (GB: JQ390622, 541 nt):

```
  1 acttaaaaat gcaccttcta ttttacaaag aaaaatggat acaattttta atgaacacag
 61 agactttgtt ttagtttatg ttgatgacat tttggttttc agtaaaaaca tacaagaaca
121 tctaggacac ctacaggtag tctttcatga atttattaaa catgggatca ttataagtaa
181 aaacaaagtt gaactctgta aaaaatacat caatttctta ggagtaacta ttagagaagg
241 aaagataaaa ttacaacccc atatagccaa gaaaatccta gacatgccag acaaacttga
301 aactcttaaa gaattacaat ccttttttagg attagtaaat tatgccagaa catttatcaa
361 ggacctagga aaaatcgcag gacctttata tgctaagact ggaaaatcag gacaaagaca
```

```
421 ctttaatgct gaagacataa aattggtcaa acaaataaaa gccctcgtat ctgaattacc
481 agacctagat cttccgttag attctgatta tattatcata gaaacagacg gttgtgattt
541 a
```

Anexo 9. Resultados del análisis loglineal jerárquico

Tablas de contingencia

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
VIRUS * SALUD	280	100,0%	0	0.0%	280	100,0%

Tabla de contingencia Combinación de la infección simple o mixta x Estado sanitario de la planta

Combinación de la infección simple o mixta	Estado sanitario planta		Total
	MWP-Sintomática	Asintomática	
PMWaV-1	5	0	5
PMWaV-2	0	21	21
PMWaV-3	6	0	6
PBCOV	7	0	7
PMWaV-1+PMWaV-2	0	3	3
PMWaV-2+PMWaV-3	1	5	6
PMWaV-1+PMWaV-3	3	0	3
PMWaV-1+PMWaV-2+PMWaV-3	4	12	16
PMWaV-1+PBCOV	5	1	6
PMWaV-2+PBCOV	0	21	21
PMWaV-3+PBCOV	5	0	5
PMWaV-1+PMWaV-2+PBCOV	0	2	2
PMWaV-2+PMWaV-3+PBCOV	0	11	11
PMWaV-1+PMWaV-3+PBCOV	4	1	5
PMWaV-1+PMWaV-2+PMWaV-3+PBCOV	0	8	8
Ningún virus	19	0	19
Total	191	89	280

Pruebas de Chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	121,396[a]	15	0,000
Razón de verosimilitudes	161,094	15	0,000
Asociación lineal por lineal	2,795	1	0,095
N de casos válidos	144		

Medidas simétricas

		Valor	Error típ. asint.[a]	T aproximada[b]	Sig. aproximada
Intervalo por intervalo	R de Pearson	-0,140	0,084	-1,682	0,095
Ordinal por ordinal	Correlación de Spearman	-0,158	0,088	-1,906	0,059
N de casos válidos		280	144		

a. Asumiendo la hipótesis alternativa. b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula. c. Basada en la aproximación normal.

Análisis loglineal jerárquico

Para el diseño 1, se ha sumado .500 a todas las casillas observadas de este modelo saturado. Este valor se puede cambiar mediante el subcomando CRITERIA = DELTA.

Información sobre los datos

		N
Casos	Válido	144
	Fuera del rango[a]	0
	Perdido	0
	Válido ponderado	144
Categorías	VIRUS	16
	SALUD	2

Frecuencias y residuos de casillas

VIRUS	SALUD	Observado		Esperado		Residuos	Residuos típicos
		Recuento[a]	%	Recuento	%		
PMWaV-1	Sana	5,500	3,8%	5,500	3,8%	0,000	0,000
	Enferma	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000
PMWaV-2	Sana	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000
	Enferma	21,500	14,9%	21,500	14,9%	0,000	0,000
PMWaV-3	Sana	6,500	4,5%	6,500	4,5%	0,000	0,000
	Enferma	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000
PBCOV	Sana	7,500	5,2%	7,500	5,2%	0,000	0,000
	Enferma	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000
PMWaV-1+PMWaV-2	Sana	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000
	Enferma	3,500	2,4%	3,500	2,4%	0,000	0,000
PMWaV-2+PMWaV-3	Sana	1,500	1,0%	1,500	1,0%	0,000	0,000
	Enferma	5,500	3,8%	5,500	3,8%	0,000	0,000
PMWaV-1+PMWaV-3	Sana	3,500	2,4%	3,500	2,4%	0,000	0,000
	Enferma	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000
PMWaV-1+PMWaV-2+PMWaV-3	Sana	4,500	3,1%	4,500	3,1%	0,000	0,000
	Enferma	12,500	8,7%	12,500	8,7%	0,000	0,000
PMWaV-1+PBCOV	Sana	5,500	3,8%	5,500	3,8%	0,000	0,000
	Enferma	1,500	1,0%	1,500	1,0%	0,000	0,000
PMWaV-2+PBCOV	Sana	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000
	Enferma	21,500	14,9%	21,500	14,9%	0,000	0,000
PMWaV-3+PBCOV	Sana	5,500	3,8%	5,500	3,8%	0,000	0,000
	Enferma	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000
PMWaV-1+PMWaV-2+PBCOV	Sana	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000
	Enferma	2,500	1,7%	2,500	1,7%	0,000	0,000
PMWaV-2+PMWaV-3+PBCOV	Sana	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000
	Enferma	11,500	8,0%	11,500	8,0%	0,000	0,000
PMWaV-1+PMWaV-3+PBCOV	Sana	4,500	3,1%	4,500	3,1%	0,000	0,000
	Enferma	1,500	1,0%	1,500	1,0%	0,000	0,000
PMWaV-1+PMWaV-2+PMWaV-3+PBCOV	Sana	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000
	Enferma	8,500	5,9%	8,500	5,9%	0,000	0,000
Ningún virus	Sana	19,500	13,5%	19,500	13,5%	0,000	0,000
	Enferma	0,500	0,3%	0,500	0,3%	0,000	0,000

Contrastes de bondad de ajuste

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Razón de verosimilitudes	0,000	0	.
Pearson	0,000	0	.

Efectos de orden K y superior

	K	gl	Razón de verosimilitudes		Pearson		Número de iteraciones
			Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	
Efectos de orden K superiores[a]	1	31	231,375	0,000	259,111	0,000	0
	2	15	161,094	0,000	121,396	0,000	2
Efectos de orden K[b]	1	16	70,281	0,000	137,715	0,000	0
	2	15	161,094	0,000	121,396	0,000	0

a. Contrasta que los efectos de orden k superiores son cero. b. Contrasta que los efectos de orden k son cero.

Asociaciones parciales

Efecto	gl	Chi-cuadrado parcial	Sig.	Número de iteraciones
VIRUS	15	65,561	0,000	2
SALUD	1	4,720	0,030	2

Estimaciones de los parámetros

Efecto	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95 %	
						Límite inferior	Límite superior
VIRUS*SALUD	1	1,239	0,711	1,743	0,081	-0,154	2,633
	2	-1,840	0,690	-2,668	0,008	-3,192	-0,488
	3	1,323	0,707	1,872	0,061	-0,062	2,708
	4	1,394	0,703	1,982	0,047	0,016	2,773
	5	-0,933	0,727	-1,283	0,199	-2,357	0,492
	6	-0,609	0,462	-1,318	0,188	-1,516	0,297
	7	1,013	0,727	1,394	0,163	-0,411	2,438
	8	-0,470	0,307	-1,532	0,125	-1,072	0,131
	9	0,690	0,462	1,492	0,136	-0,216	1,596
	10	-1,840	0,690	-2,668	0,008	-3,192	-0,488
	11	1,239	0,711	1,743	0,081	-0,154	2,633
	12	-0,764	0,744	-1,028	0,304	-2,222	0,693
	13	-1,527	0,696	-2,194	0,028	-2,892	-0,163
	14	0,590	0,472	1,250	0,211	-0,335	1,514
	15	-1,376	0,701	-1,963	0,050	-2,750	-0,002
VIRUS	1	-0,314	0,711	-0,442	0,658	-1,708	1,079
	2	0,367	0,690	0,532	0,595	-0,985	1,719
	3	-0,231	0,707	-0,327	0,744	-1,616	1,154
	4	-0,159	0,703	-0,227	0,821	-1,538	1,219
	5	-0,540	0,727	-0,744	0,457	-1,965	0,884
	6	0,235	0,462	0,508	0,612	-0,671	1,141
	7	-0,540	0,727	-0,744	0,457	-1,965	0,884
	8	1,195	0,307	3,890	0,000	0,593	1,796
	9	0,235	0,462	0,508	0,612	-0,671	1,141
	10	0,367	0,690	0,532	0,595	-0,985	1,719
	11	-0,314	0,711	-0,442	0,658	-1,708	1,079
	12	-0,709	0,744	-0,953	0,341	-2,166	0,749
	13	0,054	0,696	0,078	0,938	-1,310	1,419
	14	0,134	0,472	0,285	0,776	-0,790	1,059
	15	-0,097	0,701	-0,138	0,890	-1,471	1,277
SALUD	1	-0,040	0,168	-0,240	0,810	-0,369	0,289

Anexo 10. Avales de acreditación de la Propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2017.

La información presentada en el documento resultó de la ejecución de proyectos nacionales e internacionales liderados por el IIFT, con la colaboración de investigadores nacionales y extranjeros de reconocido prestigio internacional. Su importancia es acreditada por el Consejo Científico del IIFT, y el Grupo Empresarial Agrícola (GAG), como principales usuarios de los resultados obtenidos en los proyectos. La información generada como parte de la investigación estableció la necesidad de implementar un programa de manejo integrado de la enfermedad marchitez de la piña en Cuba, y aportó herramientas e información que servirán de base para este programa de control.

La propuesta esta avalada por las principales bases productivas donde los resultados de la propuesta se generalizaron:

1. Empresa Agroindustrial Enrique Troncoso, Pinar del Río
2. Empresa Agroindustrial Ceballos, Ciego de Ávila
3. Delegación Provincial de la Agricultura de Ciego de Ávila

También reconocen este trabajo varias instituciones nacionales e internacionales relacionadas con la investigación en la Sanidad Vegetal:

1. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV)
2. Instituto Nacional de investigaciones en Sanidad Vegetal (INISAV)
3. Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, UNICA, Ciego de Ávila.
4. Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria, EMBRAPA Mandioca y Fruticultura, Brasil
5. Grupo Internacional de Trabajo de la piña de la Sociedad Internacional en Ciencias Hortícolas (ISHS, del inglés International Society in Horticultural Sciencies)
6. Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de San José, Costa Rica
7. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Uruguay (INIA)
8. Departamento para la Implementación de Sistemas de Producción y Transformación Tropical (PERSYST), CIRAD-UPR GECO Sistemas bananeros, piña y plátano de la Estación de Bassin Plat, Islas reunión, Francia.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
EN FRUTICULTURA TROPICAL

SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD CERTIFICADO
NC- ISO 9001:2008
Registro No. 054-2014

La Habana, 21 de agosto de 2017
"Año 59 de la Revolución"

DICTAMEN CONSEJO CIENTÍFICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FRUTICULTURA TROPICAL
Propuesta a Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba
EL COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA: BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO.

El Consejo Científico del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, en su sesión del 20 de julio de 2017, aprobó en su acuerdo No. 29 para avalar el trabajo **"ELCOMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA: BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO"**para optar por el Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cubaen el año 2017. Al respecto de aportan los siguientes elementos:

- Se considera que los resultados presentados contienen una recopilación del trabajo de un grupo interdisciplinario de colectivos de investigadores del IIFT, y de otras instituciones nacionales e internacionales.
- Se valora la novedad científica, el aporte práctico y metodológico, el impacto ambiental y económico-social del trabajo, así como la contribución a la solución de problemas vinculados mediante los resultados obtenidos con la rama productiva con que se relaciona la investigación.

Se considera que el trabajo presentado abarca un tema de gran importancia y actualidad para Cuba, tomando en consideración el plan de desarrollo propuesto para el cultivo de la piña [*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merr.] en el país, que incluye tanto el mercado nacional como la exportación de frutos frescos a mercados internacionales. La propuesta presenta un estudio profundo sobre la enfermedad marchitez de la piña, y sus agentes virales asociados, en el país. Esta enfermedad, considerada el principal problema de origen viral del cultivo, se ha asociado a un complejo de ampelovirus [*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* al 5 (PMWaV-1 al -5)] (*Closteroviridae*) y badnavirus [*Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) y *Pineapple bacilliform ER virus* (PBERV) (*Caulimoviridae*)].

En este sentido en el trabajo desarrollado se obtuvo: (i) la identificación por primera vez en Cuba, y en la Cuenca del Caribe, de dos nuevos ampelovirus: PMWaV-1 y PMWaV-3, (ii) la detección por primera vez en América del badnavirus *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV), (iii) la caracterización por primera vez en América de una secuencia de endogenous Pineapple bacilliform CO virus (PBCOV) en plantas de piña, y (iv) se demostró por primera vez que la piña ratón (*Bromelia pinguin*), es un hospedante natural para PMWaV-2.

Asimismo, se estableció por primera vez en Cuba la incidencia y amplia distribución de los síntomas de la enfermedad MWP en áreas comerciales de piña y se relacionó la

Ave. 7ma. No. 3005 e/30 y 32, Miramar, Playa, La Habana, CUBA
Tele fax: (53-7) 204-6794; Teléfono: 209-3585, e-mail: despacho@iift.cu

infección de PMWaV-2 con el desarrollo de los síntomas de MWP en el país. Se implementó un servicio científico-técnico para la certificación de vitroplantas de piña libres de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 que ha permitido la exportación de estos propágulos a otros países, con el consiguiente ingreso económico por exportación. Se evaluó un método para la extracción de mezclas de ADN y ARN con calidad suficiente para ensayos de RT-PCR, PCR, PCRq y DotBlot. Se obtuvieron las proteínas de cápside viral de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 para la obtención de inmunoreactivos que posibiliten el desarrollo de inmunodiagnósticos más baratos que los métodos de RT-PCR. Los resultados presentados, a la vez que evidencian la necesidad de la implementación de una estrategia de la enfermedad marchitez de la piña en Cuba, ofrece herramientas que contribuyen a su control mediante la producción de semillas libres de virus.

Por otro lado, desde el punto de vista teórico el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas brindó nuevos datos sobre la distribución mundial de estos agentes, y la epifitiología de estas dos familias virales (*Closteroviridae* y *Caulimoviridae*) en la región. Los análisis filogenéticos, en los cuales se añadieron las secuencias obtenidas de los aislados de Cuba de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PBCOV, y ePBCOV, refuerzan las divisiones en géneros establecidas en las dos familias a las cuales pertenecen estos agentes virales. Los resultados obtenidos han sido publicados en revistas internacionales de impacto, así como en nacionales. El conocimiento se ha socializado con la participación en un conjunto de eventos nacionales e internacionales.

Los resultados se publicaron en las revistas internacionales *New disease Report* (2), *Journal of Virological Methods* (1) y *Crop Protection* (1), así como en las revistas nacionales Centro Agrícola (1) y Citrifrut (4). Además, se incluyeron en dos Premios Ramales del Ministerio de la Agricultura (2011 y 2015) y se presentaron en 12 eventos nacionales e internacionales. Durante la ejecución de esta investigación se discutieron dos tesis Licenciatura en Microbiología, una tesis de Maestría en Biología Vegetal y una de Doctor en Ciencias Biológicas, todas presentadas en la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana.

Por el rigor científico con que se ha realizado el trabajo, los aportes para la ciencia en la región, y la novedad y originalidad científica de los resultados, considero que los resultados presentados pueden ser presentados para optar por el Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el presente año. Los elementos antes expuestos anteriormente, que resumen el resultado del análisis de cada uno de estos aspectos, aparecen contenidos en el acta No. 5 del 20 de julio de 2017 (acuerdo No. 29) del Consejo Científico del IIFT.

Dr. Guillermo Rafael Garlobo Almenares
Presidente del Consejo Científico
IIFT

MSc. Maylin Rodríguez Rubial
Vice-presidente del Consejo Científico
IIFT

Ave. 7ma. No. 3005 e/30 y 32, Miramar, Playa, La Habana, CUBA
Tele fax: (53-7) 204-6794; Teléfono: 209-3585, e-mail: despacho@iift.cu

AVAL

Propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba

COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO.

A quién pueda interesar:

A través del trabajo de investigación, **COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO**, los autores de la propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba determinaron que la enfermedad marchitez de la piña, y sus agentes virales asociados, se encuentran ampliamente diseminados en Cuba. En su conjunto, los resultados constituyen una importante información que alerta sobre el riesgo que este patosistema representa para el cultivo de la piña, frutal que constituirá en un futuro próximo uno de los principales renglones de exportación de la empresa, y que se encuentra en un proyecto de desarrollo, a punto de lograrse. Por tal esta enfermedad, considerada el principal problema de origen viral del cultivo, se ha asociado a un complejo de ampelovirus [Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 al 5 (PMWaV-1 al -5)] (Closteroviridae) y badnavirus [Pineapple bacilliform CO virus (PBCOV) y Pineapple ER bacilliform virus (PBERV) (Caulimoviridae)].

Dicho trabajo desarrollado como parte de la propuesta permitió: (i) la identificación por primera vez en Cuba, y en la Cuenca del Caribe, de dos nuevos ampelovirus: PMWaV-1 y PMWaV-3, (ii) la detección por primera vez en América del badnavirus PBCOV, (iii) la caracterización por primera vez en América de una secuencia de ePBCOV en plantas de piña, y (iv) se demostró por primera vez que la piña ratón (Bromelia pinguin), es un hospedante natural para PMWaV-2. Las herramientas de diagnóstico desarrolladas permiten contar con la base para un futuro programa de manejo de la enfermedad basado en la producción de material de propagación certificado como libre de virus.

Los resultados obtenidos son conocidos, ya que han sido publicados en revistas internacionales de impacto, así como en nacionales. Su conocimiento se ha ampliado a través de un conjunto de eventos nacionales e internacionales. Por el rigor científico con que se ha realizado el trabajo, los aportes para la ciencia en la región, y la novedad y originalidad científica de los resultados, considero que los resultados presentados pueden ser presentados para optar por el Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el presente año.

Y para que así conste, firma:

Ing. Julio Trujillo Cuba
Esp. Principal Dirección técnica productiva
Empresa Agroindustrial "Enrique Troncoso"
Pinar del Rio

Pinar del Río
CITRICOS ENRIQUE TRONCOSO
Dirección

DCballos
EMPRESA AGROINDUSTRIAL CEBALLOS

DIRECCIÓN GENERAL

Ciego de Ávila, 07 de agosto de 2017
"Año 59 de la Revolución"

AVAL

Propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba

COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO.

A quién interese:

Los autores de la propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba **COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO**, determinaron que la enfermedad marchitez de la piña y sus agentes virales asociados, se encuentran ampliamente diseminados en Cuba. En su conjunto, los resultados constituyen una importante información que alerta sobre el riesgo que este patosistema representa para el cultivo de la piña, frutal que constituye uno de los principales renglones de exportación de la empresa y que se encuentra en pleno desarrollo. Esta enfermedad, considerada el principal problema de origen viral del cultivo, se ha asociado a un complejo de ampelovirus [*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* al 5 (PMWaV-1 al -5)] (*Closteroviridae*) y badnavirus [*Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) y *Pineapple ER bacilliform virus* (PBERV) (*Caulimoviridae*)].

El trabajo desarrollado como parte de la propuesta permitió: (i) la identificación por primera vez en Cuba y en la Cuenca del Caribe, de dos nuevos ampelovirus: PMWaV-1 y PMWaV-3, (ii) la detección por primera vez en América del badnavirus PBCOV, (iii) la caracterización por primera vez en América de una secuencia de ePBCOV en plantas de piña y (iv) se demostró por primera vez que la piña ratón (*Bromelia pinguin*) es un hospedante natural para PMWaV-2. Las herramientas de diagnóstico desarrolladas permiten contar con la base para un futuro programa de manejo de la enfermedad basado en la producción de material de propagación certificado como libre de virus.

Los resultados obtenidos han sido publicados en revistas internacionales de impacto, así como en nacionales. El conocimiento se ha socializado con la participación en un conjunto de eventos nacionales e internacionales. Por el rigor científico con que se ha realizado el trabajo, los aportes para la ciencia en la región y la novedad y originalidad científica de los resultados, considero que los resultados presentados pueden ser presentados para optar por el Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el presente año.

Y para que así conste firmo la presente,

Alba Elizabeth González Rodríguez
Directora Adjunta

DCballos
Director Adjunto

Dirección: Carretera a Ceballos km 9 ½. Ciego de Ávila, Cuba. Teléf. 53-33-237112 Fax: 53-33-237114 E-mail: sgeneral@ecca.co.cu

Ministerio de la Agricultura

ORDINARIO
Ejemplar No _____

Delegacion Provincial

Ciego de Ávila, 15 de agosto de 2017
"Año 59 de la Revolución"

AVAL

Propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2017
"COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO"

A quién interese:

La piña es uno de los principales frutales que se cultivan en Ciego de Ávila, y que históricamente en esta provincia se desarrollaron las mayores plantaciones comerciales de esta planta en Cuba. Luego de un periodo en el que su cultivo transitó por una depresión, tanto de las áreas plantadas como de la producción de este frutal, en la actualidad se ha implementado un plan para el desarrollo de grandes plantaciones y la introducción de un nuevo cultivar, el MD-2. Este cultivar es la base de la estrategia para intensificar nuevamente el cultivo de la piña en la provincia.

En este contexto, los resultados que se plantean en esta propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2017, constituyen una recopilación de información y herramientas que contribuirán al mejoramiento y sostenibilidad de este cultivo. Se determinó que la enfermedad marchitez de la piña, uno de los principales factores bióticos limitantes del desarrollo de este frutal, y sus agentes virales asociados, se encuentran ampliamente diseminados en Cuba. En su conjunto, los resultados constituyen una importante información que alerta sobre el riesgo que este patosistema representa para la piña en el país, frutal que constituye una vía principal de exportación en la provincia de Ciego de Ávila, y que se encuentra en pleno desarrollo. Las herramientas de diagnóstico desarrolladas permiten contar con la base para un futuro programa de manejo de la enfermedad basado en la producción de material de propagación certificado como libre de virus.

Por el rigor científico con que se ha realizado el trabajo, los aportes para la ciencia en la región, y la novedad y originalidad científica de los resultados, consideramos que los resultados presentados pueden ser presentados para optar por el Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el presente año.

Y para que así conste, firmo la presente,

Damián Ortiz Sayas
Espec. Depto. Agrícola
Cultivo Frutales

DELEGACION PROV. I.N.F.A. ECONOMICO CIEGO DE AVILA

RS:
Ejecutor:

República de Cuba

Delegación Provincial Ciego de Avila
Máximo Gómez esq 5ta,Ciego de Avila
teléf. 225151 fax 223626

REPÚBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE LA AGRICULTURA
Dirección de Sanidad Vegetal

La Habana, 17 de Agosto del 2017.
"Año 59 de la Revolución".

AVAL

Propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2017
COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO.

La enfermedad marchitez de la piña está considerada a nivel mundial como la principal plaga de origen viral del cultivo de la piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.], puede ocasionar pérdidas de hasta un 40% de los rendimientos. La propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba: "**COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO**", presenta un estudio profundo sobre esta plaga y sus agentes virales asociados. El trabajo desarrollado como parte de la propuesta permitió: (i) la identificación por primera vez en Cuba, y en la Cuenca del Caribe, de dos nuevos ampelovirus: PMWaV-1 y PMWaV-3, (ii) la detección por primera vez en América del badnavirus *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV), (iii) la caracterización por primera vez en América de una secuencia de endogenous Pineapple bacilliform CO virus (PBCOV) en plantas de piña, y (iv) se demostró por primera vez que la piña ratón (*Bromelia pinguin*), es un hospedante natural para PMWaV-2.

Como resultado del trabajo se estableció por primera vez en Cuba la incidencia y amplia distribución de los síntomas de la enfermedad en áreas comerciales de piña y se relacionó la infección de PMWaV-2 con el desarrollo de los síntomas en el país. Además se implementaron metodologías para el diagnóstico de todos los agentes virales detectados, las cuales servirán de base al programa para el control de esta importante plaga en el país, que contribuirán a disminuir la diseminación de estos agentes.

Los resultados obtenidos han tenido una amplia socialización, ya sea por las variadas publicaciones en revistas internacionales de impacto, así como en nacionales y la participación en un conjunto de eventos nacionales e internacionales. De la misma forma, constituyeron dos premios otorgados por el Ministerio de la Agricultura a la Ciencia, en el año 2011 y 2015. Por el rigor científico con que se ha realizado el trabajo, los aportes para la ciencia en la región, y la novedad y originalidad científica de los resultados, considero que los resultados presentados pueden ser presentados para optar por el Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el presente año.

Fraternalmente,

Gilberto Díaz López

INISAV
Instituto de
Investigaciones
de Sanidad Vegetal

Dirección

8 de Agosto de 2017
"Año 59 de la Revolución"

AVAL
Propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2017
COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO.

A quien pueda interesar:

La enfermedad marchitez de la piña, (MWP) siglas en inglés de Mealybug Wilt of Pineapple, es considerada el principal problema de origen viral del cultivo de la piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.] en el mundo. Su etiología aun no se ha dilucidado y se ha asociado a un complejo de ampelovirus [*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* al 5 (PMWaV-1 al -5)] (*Closteroviridae*) y badnavirus [*Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) y *Pineapple ER bacilliform virus* (PBERV) (*Caulimoviridae*)].

La propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba **COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO**, presenta un estudio profundo sobre la enfermedad marchitez de la piña, y sus agentes virales asociados, en Cuba. El trabajo desarrollado como parte de la propuesta permitió: (i) la identificación por primera vez en Cuba, y en la Cuenca del Caribe, de dos nuevos ampelovirus: PMWaV-1 y PMWaV-3, (ii) la detección por primera vez en América del badnavirus *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV), (iii) la caracterización por primera vez en América de una secuencia de endogenous *Pineapple bacilliform* CO *virus* (PBCOV) en plantas de piña, y (iv) se demostró por primera vez que la piña ratón (*Bromelia pinguin*), es un hospedante natural para PMWaV-2. Asimismo, se estableció por primera vez en Cuba la incidencia y amplia distribución de los síntomas de la enfermedad MWP en áreas comerciales de piña y se relacionó la infección de PMWaV-2 con el desarrollo de los síntomas de MWP en el país.

Calle 110 No. 514 e/ 5ta B y 5ta F, Playa. La Habana, Cuba
Teléfono: 202-6788
E-mail: mveitia@inisav.cu
www.inisav.cu

RS 1172/2017

El análisis de los resultados aportó nuevos datos sobre la distribución mundial de estos agentes, y la epifitiología de estas dos familias virales (*Closteroviridae* y *Caulimoviridae*) en la región. Los análisis filogenéticos, en los cuales se añadieron las secuencias obtenidas de los aislados de Cuba de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PBCOV, y ePBCOV, refuerzan las divisiones en géneros establecidas en las dos familias a las cuales pertenecen estos agentes virales.

Los resultados obtenidos han sido publicados en revistas internacionales de impacto, así como en nacionales. El conocimiento se ha socializado con la participación en un conjunto de eventos nacionales e internacionales. Por el rigor científico con que se ha realizado el trabajo, los aportes para la ciencia en la región, y la novedad y originalidad científica de los resultados, así como la importancia de estos resultados para el manejo de organismos nocivos al cultivo de la piña consideramos que los resultados presentados pueden ser presentados para optar por el Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el presente año.

Y para que así conste, firmo el presente,

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal
Dirección General
INISAV

Dra. Marlene M. Veitía Rubio
Directora
INISAV

Calle 110 No. 514 e/ 5ta B y 5ta F, Playa. La Habana, Cuba
Teléfono: 202-6788
E-mail: mveitia@inisav.cu
www.inisav.cu

UNIVERSIDAD DE CIEGO DE ÁVILA MÁXIMO GÓMEZ BÁEZ
CENTRO DE BIOPLANTAS
CONSEJO CIENTIFICO DE LA CIENCIA AGROPECUARIA Y BIOTECNOLOGICA

DICTAMEN No. 57

En sesión de trabajo del Consejo Científico del Centro de Bioplantas, se presentó como propuesta a Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba:

COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO.

Autor principal: MSc. Lester Hernández Rodríguez.

Los resultados contenidos en la propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba **COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO**, presentan un estudio profundo sobre la enfermedad marchitez de la piña, y sus agentes virales asociados, en Cuba. La enfermedad, considerada el principal problema de origen viral del cultivo, se ha asociado a un complejo de ampelovirus [*Pineapplemealybugwilt-associated virus 1* al 5 (PMWaV-1 al -5)] (*Closteroviridae*) y badnavirus [*Pineapplebacilliform CO virus* (PBCOV) y *Pineapple ER bacilliform virus* (PBERV) (*Caulimoviridae*)].

La identificación por primera vez en Cuba, y en la Cuenca del Caribe, de dos nuevos ampelovirus: PMWaV-1 y PMWaV-3, así como la detección por primera vez en América del badnavirus *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV), y endogenous Pineapple bacilliform CO virus (PBCOV) en plantas de piña, alertó sobre la necesidad de tomar medidas para el manejo del patosistema MWP en el país.

En este contexto, y tomando en consideración que el Centro de Bioplantas comercializa propágulos de piña (*Ananas comosus var. comosus* cv. 'MD-2'), los métodos de diagnósticos desarrollados por los autores han servido de base para la implementación de un servicio de certificación del material de propagación, el cual ha sido incorporado al instructivo técnico de la propagación masiva de piña mediante la técnica de cultivo in vitro. Este servicio contribuyó a partir del año 2016 a la comercialización y desarrollo en campo de 131,723 plántulas de piña certificadas libre de virus a entidades como EAFM ¨Cor. Arturo Lince¨, Sabaneta Guantánamo; EAM- AGROFAR, Santo Domingo, Villa Clara; CCS ¨Antonio Regalado¨ del municipio Primero de Enero, Ciego de Ávila y la Empresa Flora y Fauna de Sancti Spiritus. En un futuro cercano permitirá la exportación de vitroplantas de piña a varios países lo cual también generará ingresos para nuestra institución y al país.

De manera general, el análisis de los resultados contenidos en la propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2017, brindó nuevos datos sobre la distribución mundial de estos agentes, y la epifitiología de estas dos familias virales (*Closteroviridae* y

Caulimoviridae) en la región. Los análisis filogenéticos, en los cuales se añadieron las secuencias obtenidas de los aislados de Cuba de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PBCOV, y ePBCOV, refuerzan las divisiones en géneros establecidas en las dos familias a las cuales pertenecen estos agentes virales. Los resultados obtenidos han sido publicados en revistas internacionales de impacto, así como en nacionales. El conocimiento se ha socializado con la participación en un conjunto de eventos nacionales e internacionales.

El Consejo Científico evaluó el rigor científico con que se ha realizado el trabajo, los aportes para la ciencia en la región, y la novedad y originalidad científica de los resultados Por la calidad del documento presentado se considera que reúne los requisitos para optar por el Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, por lo que se tomó el Acuerdo 42/2017.

Dado en Ciego de Ávila, a los 14 días del mes de Julio de 2017.

CENTRO DE BIOPLANTAS
UNICA - MES CUBA
CIEGO DE AVILA

Dr.C. Oscar V. Concepción Laffitte
Presidente del Consejo Científico.
Ciencias Agropecuarias y Biotecnológicas
Centro de Bioplantas

AVAL

Propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba

COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO.

A quién interese:

La propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba del trabajo titulado **"COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO"** presenta un estudio profundo de la enfermedad marchitez de la piña en dicho país. La enfermedad, que es considerada el principal problema de origen viral del cultivo, está asociada a un complejo de ampelovirus [pineapple mealybug wilt-associated virus 1 al 5 (PMWaV-1 al -5)] (*Closteroviridae*) y badnavirus [pineapple bacilliform CO virus (PBCOV) y pineapple ER bacilliform virus (PBERV) (*Caulimoviridae*)].

El trabajo desarrollado permitió (i) la identificación por primera vez en Cuba y en la cuenca del Caribe de los ampelovirus PMWaV-1 y PMWaV-3, y del badnavirus pineapple bacilliform CO virus (PBCOV), (ii) la detección y caracterización parcial de una secuencia endógena de pineapple bacilliform CO virus (PBCOV), y (iii) la detección, por primera vez, de la piña ratón (*Bromelia pinguin*) como hospedante natural de PMWaV-2. Igualmente, el trabajo permitió establecer la incidencia y distribución de la enfermedad en las áreas comerciales de piña en ese país y establecer una correlación entre la infección por PMWaV-2 y la presencia de síntomas de la enfermedad. Desde un punto de vista integral, los resultados permiten actualizar los datos sobre la distribución mundial y la epifitiología de los miembros de las familias virales *Closteroviridae* y *Caulimoviridae*. Las secuencias nucleotídicas obtenidas de los aislados cubanos de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 refuerzan la subdivisión en dos grupos de las especies dentro del género ampelovirus.

Los resultados obtenidos han sido publicados en revistas internacionales de impacto, así como en varias revistas nacionales. El conocimiento se ha socializado con la participación en más de una decena de eventos y congresos nacionales e internacionales.

Por el rigor científico con que se ha realizado el trabajo, los aportes para la ciencia en la región, y la novedad y originalidad científica de los resultados, considero que los resultados presentados pueden ser presentados para optar por el Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el presente año.

Cordialmente,

Dra. Juliana Freitas-Astúa
Juliana.astua@embrapa.br
Investigadora en Fitopatología/ Biología Molecular
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, Bahia,
Brasil

Embrapa

Mandioca e Fruticultura

Cruz das Almas, Bahia, Brazil, August 09, 2017

TO WHOM IT MAY CONCERN

This letter is in support to the authors of the proposal to the award of the Academy of Sciences of Cuba 2017 entitled: "VIRAL COMPLEX ASSOCIATED WITH THE PINEAPPLE MEALYBUG WILT (PMW) DISEASE IN CUBA, BASES FOR ESTABLISHMENT OF ITS MANAGEMENT" [**COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO**].

Mealybug wilt of pineapple is considered a world-wide constraint for this fruit crop and has been associated to a complex of ampelovirus [*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* to 5] (*Closteroviridae*) and badnavirus [*Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) and *Pineapple bacilliform ER virus* (PBERV) (*Caulimoviridae*)].

The work developed as part of the proposal allowed for: (i) identification of two new ampeloviruses in Cuba and in the Caribbean Basin: *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* and 3 (PMWaV-1 and -3), (ii) detection for the first time in America of *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV), (Iii) the first characterization in America of a sequence of endogenous Pineapple bacilliform CO virus (ePBCOV) in pineapple plants, and (iv) it demonstrated for the first time that *Bromelia pinguin* L. is a natural host for PMWaV-2. The incidence and wide distribution of symptoms of PMW disease in commercial pineapple areas was also established for the first time in Cuba and the PMWaV-2 infection was related to the development of PMW symptoms in the country.

Due to the scientific rigor with which the work was done, the contributions to science in the region, and the novelty and scientific originality of the results, I consider that it is fully justified to submit it as proposal for the Award of the Academy of Sciences of Cuba in the current year.

Domingo Haroldo Reinhardt, PhD. Plant Biology at UC Davis
Research Scientist
Embrapa Mandioca e Fruticultura, Brazil
President of the Pineapple Working Group of the International Society of Horticultural Sciences (ISHS)

AVAL

Propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2017

COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO

Autores del Instituto de Investigación en Fruticultura Tropical (IIFT), La Habana, Cuba

A quién interese:

La enfermedad marchitez de la piña es el principal problema de origen viral de este frutal, con pérdidas que pueden llegar hasta el 55 % de los rendimientos de las cosechas de piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. Aunque se han desarrollado varios trabajos, aún no se ha dilucidado su agente causal y se ha asociado a un complejo de ampelovirus [*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* al 5 (PMWaV-1 al -5)] (*Closteroviridae*) y badnavirus [*Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) y *Pineapple ER bacilliform virus* (PBERV) (*Caulimoviridae*)].

La propuesta al Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2017 titulado **"COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA EL ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO"**, presenta la caracterización de la enfermedad marchitez de la piña, y sus agentes virales asociados en Cuba. Este trabajo incluyó: (i) la identificación por primera vez en Cuba, y en la Cuenca del Caribe, de dos nuevos ampelovirus: PMWaV-1 y PMWaV-3, (ii) la detección por primera vez en América del badnavirus *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV), (iii) la caracterización por primera vez en América de una secuencia de endogenous Pineapple bacilliform CO virus (PBCOV) en plantas de piña, y (iv) se demostró por primera vez que la piña ratón (*Bromeliapinguin*), es un hospedante natural para PMWaV-2. Asimismo, se estableció por primera vez en Cuba la incidencia y amplia distribución de los síntomas de la enfermedad MWP en áreas comerciales de piña y se relacionó la infección de PMWaV-2 con el desarrollo de los síntomas de MWP en el país.

El análisis de las mismas brindó nuevos datos sobre la distribución mundial de estos agentes, y la epifitiología de estas dos familias virales (*Closteroviridae* y *Caulimoviridae*) en la región. Los análisis filogenéticos, en los cuales se añadieron las secuencias obtenidas de los aislados de Cuba de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PBCOV, y ePBCOV, refuerzan las divisiones en géneros establecidas en las dos familias a las cuales pertenecen estos agentes virales.

Al igual que en Cuba, la piña es uno de los frutales de mayor importancia en Costa Rica. Como parte de desarrollo del cultivo de este frutal en Cuba, se han introducido materiales de propagación del cultivar 'MD-2' en varias ocasiones desde el año 2009. En este sentido, los resultados de esta propuesta contribuirán a disminuir los riesgos en la diseminación de estos patógenos al aportar metodologías para su diagnóstico que pueden ser implementadas en programas de vigilancia cuarentenaria y postentrada del material vegetal de propagación. Varios de los trabajos contenidos en esta propuesta se realizaron satisfactoriamente en colaboración con el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.

Los resultados obtenidos han sido publicados en revistas internacionales de impacto, así como en nacionales. El conocimiento se ha socializado con la participación en un conjunto de eventos nacionales e internacionales. Por el rigor científico con que se ha realizado el trabajo, los aportes para la ciencia en la región, y la novedad y originalidad científica de los resultados, considero que los resultados presentados pueden ser presentados para optar por el Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el presente año.

Y para que así conste, firmo la presente,

William Villalobos Muller

Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR UNIVERSIDAD DE COSTA RICA CIBCM

40 Aniversario CIBCM UCR 1977 - 2017

cc. archivo

AVAL

Propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba

COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO.

A quién interese:

La piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.] es un cultivo de alta importancia económica para varios países de la región del Caribe y América Centro y del Sur. La propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba **COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO**, presenta un estudio profundo a cerca de la enfermedad marchitez de la piña y sus agentes virales asociados, en Cuba. Esta enfermedad, considerada el principal problema de origen viral del cultivo, se ha asociado a un complejo de ampelovirus [*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* al 5 (PMWaV-1 al -5)] (*Closteroviridae*) y badnavirus [*Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) y *Pineapple bacilliform ER virus* (PBERV) (*Caulimoviridae*)].

El trabajo desarrollado como parte de la propuesta permitió: (i) la identificación por primera vez en Cuba, y en la Cuenca del Caribe, de dos nuevos ampelovirus: PMWaV-1 y PMWaV-3, (ii) la detección por primera vez en América del badnavirus *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV), (iii) la caracterización por primera vez en América de una secuencia de endogenousPineapplebacilliform CO virus (PBCOV) en plantas de piña, y (iv) se demostró por primera vez que la piña ratón (*Bromelia pinguin*), es un hospedante natural para PMWaV-2. Asimismo, se estableció por primera vez en Cuba la incidencia y amplia distribución de los síntomas de la enfermedad MWP en áreas comerciales de piña y se relacionó la infección de PMWaV-2 con el desarrollo de los síntomas de MWP en el país.

Los productos generados como resultado de la investigación, como los métodos de diagnóstico, facilitarán el intercambio de material de propagación libre de virus, disminuyendo la diseminación de estos agentes, y propiciando herramientas que

permitirán la introducción de propágulos en Cuba. Asimismo, la metodología de extracción de ARN/ADN que permite el diagnóstico simultaneo de ampelovirus y badnavirus representa un ahorro importante en el costo del análisis por muestra, y es amigable con el medio ambiente al ser un procedimiento libre de agentes orgánicos. Este último producto se obtuvo como un atrabajo de colaboración entre los autores de la propuesta y la estación Experimental Salto Grande del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), de Uruguay.

Los resultados obtenidos han sido publicados en revistas internacionales de impacto, así como en nacionales. El conocimiento se ha socializado con la participación en un conjunto de eventos nacionales e internacionales. Por el rigor científico con que se ha realizado el trabajo, los aportes para la ciencia en la región, y la novedad y originalidad científica de los resultados, considero que los resultados presentados pueden ser presentados para optar por el Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el presente año.

Y para que así conste, firmo la presente,

Lic. Ana Arruabarrena, MSc.
Investigador Adjunto
Labratorio de Biotecnología
INIA Salto Grande
Uruguay

cirad
LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT

La Réunion, 25/07/2017

De : DR & HDR Alain SOLER

Laboratorio Agro-fisiología CIRAD
Dpt PERSYST, UPR GECO Sistemas de producción Banano, Piña y Plátano
St PIERRE de la Réunion.
Tel +262 262969361
Email : alain.soler@cirad.fr

AVAL : Propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba

COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO (MSc Lester HERNANDEZ)

A quién interese:

La propuesta a Premio de la Academia de Ciencias de Cuba **COMPLEJO VIRAL ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA PIÑA EN CUBA, BASES PARA ESTABLECIMIENTO DE SU MANEJO**, presenta un estudio profundo sobre la enfermedad marchitez de la piña, y sus agentes virales asociados, en Cuba. Esta enfermedad, considerada el principal problema de origen viral del cultivo, se ha asociado a un complejo de ampelovirus [*Pineapple Mealybug Wilt-associated virus 1* al 5 (PMWaV-1 al -5)] (*Closteroviridae*) y badnavirus [*Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV) y *Pineapple ER bacilliform virus* (PBERV) (*Caulimoviridae*)].

Los resultados obtenidos por los autores tienen un impacto importante para la región, resaltan por (i) la identificación por primera vez en Cuba, y en la Cuenca del Caribe, de dos nuevos ampelovirus: PMWaV-1 y PMWaV-3, (ii) la detección por primera vez en América del badnavirus *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV), (iii) la caracterización por primera vez en América de una secuencia de endogenous Pineapple bacilliform CO virus (PBCOV)

cirad
LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT

en plantas de piña, y (iv) la demostración por primera vez que la piña ratón (*Bromelia pinguin*), es un hospedante natural para PMWaV-2.

El conjunto de estos resultados alerta sobre la necesidad de implementar programas a nivel regional que permitan limitar la diseminación de estos agentes virales. En este sentido, los métodos de diagnóstico y caracterización desarrollados servirán de herramientas para implementar programas que permitan el intercambio de material de propagación de piña con seguridad sanitaria de estar libre de estos virus.

Asimismo, el análisis de las mismas brindó nuevos datos sobre la distribución mundial de estos agentes, y la epifitiología de estas dos familias virales (*Closteroviridae* y *Caulimoviridae*) en la región. Los análisis filogenéticos, en los cuales se añadieron las secuencias obtenidas de los aislados de Cuba de PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PBCOV, y ePBCOV, refuerzan las divisiones en géneros establecidas en las dos familias a las cuales pertenecen estos agentes virales.

Los resultados obtenidos han sido publicados en revistas internacionales de impacto, así como en nacionales. El conocimiento se ha socializado con la participación en un conjunto de eventos nacionales e internacionales. Por el rigor científico con que se ha realizado el trabajo, los aportes para la ciencia en la región, y la novedad y originalidad científica de los resultados, considero que los resultados presentados pueden ser presentados para optar por el Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el presente año.

Y para que así conste, firmo la presente,

CENTRE de COOPERATION INTERNATIONALE en RECHERCHE AGRONOMIQUE pour le DÉVELOPPEMENT
CIRAD REUNION
40, Chemin de Grand Canal
CS 12014
97743 ST-DENIS CEDEX 9
Tél. : 02 62 52 80 00

Dr & HDR A.SOLER

Département Performances des systèmes de production et de transformation tropicaux (PERSYST)
Station de Bassin-Plat - B.P 180 - 97455 SAINT-PIERRE – ILE DE LA REUNION
Tel. :+262 262 96 93 60 – Fax : +262 262 96 93 68
SIRET : 331 596 270 00180

Etablissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) - SIREN 331596270 - RCS Paris B 331 596 270

Anexo 11. Acreditación de las publicaciones, Premios Ramales del MINAG, presentaciones en eventos y talleres.

Los resultados se publicaron en las revistas internacionales *New disease Report* (2), *Journal of Virological Methods* (1) y *Crop Protection* (1), así como en las revistas nacionales Centro Agrícola (1) y Citrifrut (4). Además los resultados se incluyeron en dos Premios Ramales del Ministerio de la Agricultura y se presentaron en 12 eventos nacionales e internacionales. Además, los resultados conformaron dos tesis Licenciatura en Microbiología, una tesis de Maestría en Biología Vegetal y una de Doctor en Ciencias Biológicas, todas presentadas en la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. Se obtuvieron nueve Resultados de la Investigación Científica y dos Introducciones Directas.

Artículo Científico

La marchitez de la piña producida por cochinillas, ¿Un problema complejo o un complejo de problemas?

Lester Hernández Rodríguez e Inés Peña Bárzaga.

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave. 7ma No. 3005 e/ 30 y 32, Miramar, Playa, La Habana, Cuba
Email: lesterhernandez@iift.cu; inespbarzaga@iift.cu

RESUMEN
La enfermedad de la marchitez de la piña producida por cochinillas es una de las principales limitantes en la producción mundial de piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. La etiología es un complejo de factores en el que se involucran un grupo de virus ubicados dentro de la familia Closteroviridae, género *Ampelovirus*, nombrados *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* (PMWaVs) y trasmitidos por cochinillas. Además, las hormigas tienen una función importante en la diseminación de la enfermedad dentro de las plantaciones. En el año 1998, se informó por primera vez en plantas de piña de Cuba, la presencia de partículas virales flexuosas con formas de varillas similares a la estructura informada en la literatura para los viriones de virus de la familia Closteroviridae. En el 2007 se publicó la secuencia de varios fragmentos del aislado cubano del virus, los cuales comparten identidades nucleotídicas por encima del 98% con secuencias del PMWaV-2 de Hawai. Este trabajo es una revisión actualizada de la información publicada sobre esta temática tanto en Cuba como internacionalmente.

Palabras clave: Ampelovirus, PMWaV, cochinillas y piña

ABSTRACT
Mealybug wilt of pineapple (MWP) is a major constraint on the global production of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. The etiology is a complex in which are involved a group of viruses named *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* (PMWaVs), belonging to the family Closteroviridae*,* genus *Ampelovirus* and mealybugs-transmitted. Besides, the ants play an important role in the spread of the disease inside the crops. The presence of these viruses in pineapple plants was firstly reported in Cuba in 1998 by finding rodshaped flexuous virus particles similars to those described for virions already classified in the family Closteroviridae. In 2007, the sequences of several fragments of the Cuban isolate were published, and they shared sequence identities over the 98% with those of the PMWaV-2 of Hawaii. This work is aimed to review the published information about this subject either in Cuba as worldwide.

key words: Ampelovirus, PMWaV, mealybugs and pineapple.

LA ENFERMEDAD, SÍNTOMAS Y REPORTES MUNDIALES

La piña es una planta monocotiledónea, perenne, xerofítica y ubicada dentro de la familia Bromeliaceae. Es afectada por varios patógenos entre los que se destacan los nemátodos parásitos de plantas, hongos, bacterias, insectos de tipo coccoideos y el complejo de ampelovirus que causan el marchitamiento de la piña por cochinillas o MWP (Rohrbach y Apt, 1986).

El marchitamiento de la piña por cochinillas, nombre derivado del término en inglés *Mealybug Wilt of Pineapple* (MWP), es una enfermedad reportada en gran parte de los países productores de este frutal en el mundo: Hawai, Sri Lanka, Tailandia, Brasil, Australia, Cuba, países de Centroamérica y las islas del Caribe y recientemente en Taiwán (Carter 1942 y 1945 citado por Sether y Hu, 2002a; Borroto *et al*., 1998, 2007; Singhe y Sastry, 1974; Rohrbach *et al*., 1988; Hu *et al*., 1993, 1997; Hughes y Samita, 1998; Wakman *et al*., 1995 y Shen, 2009). Su impacto en las áreas productoras ha llegado a ser de pérdidas desde un 25 hasta el 100% de las cosechas (Sether y Hu, 2002b). En las plantaciones de piña en Cuba las pérdidas han alcanzado cifras hasta el 40% (Anónimo, 1989).

Los síntomas más comunes de la enfermedad comprenden el enrojecimiento y bronceado de las hojas (Figura 1), pérdida de turgencia y muerte regresiva de la hoja, reducción de la masa radicular, cambios en los

ciclos de fructificación, reducción de la talla del fruto y de su calidad debido a la consistencia fibrosa y el sabor ácido, que afectan su valor comercial (Sether y Hu, 2002a y citas de Carter, 1945 en dicha publicación).

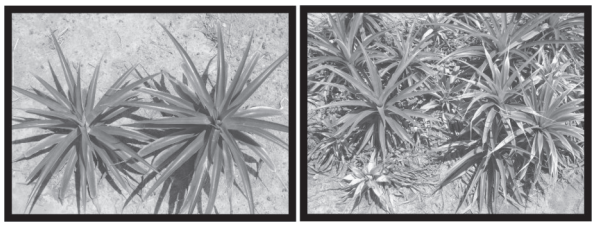


Fig. 1. Plantas de piña con síntomas de marchitez típicos de MWP
Fotos: Lic. Lester Hernández Rodríguez

Se han descrito tres fases para el desarrollo de la enfermedad. En la primera fase, se desarrolla una coloración de bronceada a púrpura en las 3^{ras} y 4^{tas} hojas de la corona, comenzando por el corazón. Los márgenes de las hojas se curvan hacia la cara inferior, pero la zona del ápice permanece erecta. Posteriormente, en un segundo estadio, el color de las hojas se torna rojo brillante o amarillo, al mismo tiempo que las hojas pierden la turgencia y el ápice se vuelve carmelita. Cuando la planta alcanza la tercera fase, las hojas más jóvenes son erectas pero carentes de turgencia, mientras el ápice de la mayoría de las otras hojas es curvado y de color pardo oscuro. Después de la aparición de estos síntomas ocurre una reducción significativa del sistema radicular.

Si la enfermedad se manifiesta cuando las plantas tienen diferenciada la inflorescencia, estas se secan. Cuando se manifiesta más tarde, las hojas de los frutos permanecen prominentes y la pulpa es fibrosa y ácida. Es importante la asincronía que se produce en los tiempos de fructificación y maduración entre las plantas enfermas y sanas, lo que atenta, al igual que la baja calidad de los frutos, contra la rentabilidad de la producción de una plantación de piña.

Algunas plantas revierten los síntomas en un estadio avanzado del desarrollo de la enfermedad, de tal forma que las nuevas hojas van brotando del color verde normal de las plantas sanas aparentando una completa recuperación (Sether y Hu, 2002a). Este hecho, lejos de beneficiar, puede determinar que los productores tomando la planta como sana, pero que aún está infectada, colecten las coronas y los hijos como material de propagación, lo que propicia que posteriormente se disemine la enfermedad en la nueva plantación que se va a formar con estos propágulos.

Además, se ha observado que en plantas de piña (cv. Cayena lisa) con síntomas severos de MWP se desarrollan importantes cambios metabólicos inducidos por la enfermedad, entre los cuales se incluyen la aparición de altos niveles de ácido abcísico, proteínas solubles, prolina y fenoles libres, acompañados de un aumento en la actividad peroxidasa e invertasa, los que en conjunto pudieran explicar algunos de los síntomas determinados para la MWP (Nieves *et al*., 1996).

ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA MWP

En las primeras descripciones de MWP, los síntomas fueron asociados al daño producido por las cochinillas y no a causas de origen viral, por lo que primeramente se le denominó marchitez de la piña producida por cochinillas y este término actualmente sigue identificando la enfermedad. Posteriormente se determinó que la etiología de la enfermedad es un complejo de factores en el que están involucrados primeramente varias especies de virus del género *Ampelovirus*, familia Closteroviridae. Estos virus se nombran de forma genérica Virus asociados a la Marchitez de la Piña por Cochinillas, derivado del término en inglés *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus,* por lo que el acrónimo es PMWaV (Sether y Hu, 2002a y b). Los estudios realizados hasta el momento, sugieren que estos virus, en asociación con los cóccidos, son los responsables de la manifestación de síntomas de MWP (Sether *et al.,* 2005a).

Es importante señalar que no basta con que esté presente el virus en la planta para que se desarrollen los síntomas de MWP, es imprescindible que se hayan establecido además, individuos de una colonia de chinches harinosas principalmente las cochinillas grises y/o rosadas, *Dysmicoccus brevipes* Cockerell y *D.neobrevipes* Beardsley respectivamente, y que estas estén alimentándose de la planta (Sether y Hu, 2002b). La explicación a este hecho aún no está clara, las hipótesis indican que pudieran liberarse en el momento de la alimentación en la planta, toxinas del insecto que se asocien a proteínas virales, ya sea las relacionadas con el movimiento del virus en la planta o las de desarrollo de los síntomas. Dicho de otro modo, al alimentarse la cochinilla en la planta, se pudieran liberar estas sustancias que actuarían como cofactores de las proteínas relacionadas con la inducción de los síntomas, o que modifiquen estás últimas, de tal forma que sólo se activen al interactuar una con otra. Borroto *et al*., 2007, en experimentos de sistemas de dos híbridos de levaduras (Colas y Brent, 1998), ensayos ampliamente utilizados para estudiar la interacción proteína-proteína de los closterovirus (Gowda *et al*., 2000), de-

Artículo Científico

Detección de ampelovirus asociados a la enfermedad de la marchitez de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en la Isla de la Juventud, Cuba

Lester Hernández; Pedro Luis Ramos; Maylín Rodríguez; Victoria Zamora; Ines Peña y Juana M. Pérez

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave. 7ma No. 3005 e/ 30 y 32. Miramar. Playa. La Habana. Cuba.
E-mail: lesterhernandez@iift.cu

RESUMEN

La marchitez de la piña es una enfermedad limitante de la producción en todas las áreas destinadas a este frutal en el mundo. En la etiología de la enfermedad se relacionan cinco ampelovirus: *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 al -5 (PMWaV-1 al -5) (*Closteroviridae: Ampelovirus*) los cuales son transmitidos por cochinillas (*Dysmococcus* sp.). En junio del 2009, en la Isla de la Juventud, Cuba; se observaron plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), cultivar Española Roja, con síntomas severos de marchitez y enrojecimiento foliar y a la vez, se detectaron poblaciones de cochinillas asociadas a estas plantaciones. En tres fincas con 27 777, 13 888 y 19 444 plantas, a dos km de distancia, se determinó una incidencia de 25,2, 38,4 y 51,4% de plantas con los síntomas de marchitez, respectivamente. La detección de los virus PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 se realizó mediante la amplificación a través de RT-PCR, de un fragmento del gen que codifica para la proteína de shock térmico (HSP70h). Los amplicones obtenidos se clonaron y secuenciaron. Los análisis comparativos mostraron un 98 y 99% de identidad de sus secuencias con los respectivos fragmentos de los genomas depositados en la base *GenBank* de los virus PMWaV-3 y PMWaV-2. No se detectó la presencia de PMWaV-1 en ninguna de las muestras colectadas.

Palabras clave: ampelovirus, piña, PMWaV.

ABSTRACT

Pineapple mealybug wilt of disease is one of the major constraints of this crop worldwide. The disease has been associated to five ampeloviruses transmitted by mealybug (*Dysmococcus* sp.) which have been named: *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 to -5 (PMWaV-1 to -5) (*Closteroviridae*: *Ampelovirus*). In a survey conducted in the sla de la Juventud in June 2009 pineapple plants (*Ananas comosus* (L.) Merr.) from the cultivar Española Roja showing severe symptoms of wilt and foliar reddening were observed. At the same time, the presence of mealybugs, the virus vectors, was confirmed in these fields. The study conducted in three pineapple fields (two km from each other) with 27 777, 13 888 y 19 444 plants showed disease incidences of 25.2, 38.4 y 51.4%, respectively. Detection of PMWaV-1, PMWaV-2 and PMWaV-3 were carried out by RT-PCR assays to amplify a fragment of the heat shock protein ORF (HSP70h). Amplicons obtained were cloned and sequenced. Sequence comparisons showed 99 and 98% of nucleotide identity percentages between the obtained amplicons and PMWaV-2 and PMWaV-3 sequences submitted to the *GenBank* database. No signal was obtained in reactions addressed to identify the presence of PMWaV-1.

Key words: ampeloviruses, pineapple, PMWaV

INTRODUCCIÓN

La enfermedad marchitez de la piña producida por cochinillas (MWP, siglas del término en inglés *mealybug wilt of pineapple*), descrita desde principios del siglo XX, es una de las principales limitaciones en todas las áreas productoras de este frutal en el mundo (Rohrbach and Johnson, 2003; Sether *et al*., 2009). En la etiología de MWP, se involucran cinco especies virales miembros del género *Ampelovirus*, familia *Closteroviridae,* que se nombran: *Pineapple mealybug wilt-associated virus* -1, -2, -3, -4 y -5, (acrónimos PMWaV-1, -2, -3, -4 y -5) (Sether *et al*., 2005, Gambley *et al*., 2008). Estos virus son transmitidos por cochinillas rosadas y grises (*Dysmicoccus brevipes* Cockerell y *D. neobrevipes* Beardsley, respectivamente) (Sether *et al*., 1998).

Los miembros de la familia *Closteroviridae* poseen un genoma mono o bipartita, de ARN simple cadena y polaridad positiva. Los viriones presentan una morfología de varilla flexuosa, abierta y filamentosa. La familia se divide en tres géneros atendiendo al insecto vector y al número de componentes de su genoma: *Closterovirus*, cuyos miembros son monopartitas y transmitidos por áfidos; *Crinivirus*, bipartitas y que se transmiten por

New Disease Reports

First report of *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* infecting pineapple in Cuba

L. Hernández, P.L. Ramos*, M. Rodríguez, I. Peña and J.M. Pérez

Research Institute on Tropical Fruit Crops, P.O. Box 11 300, 7th Ave., # 3005, Playa, Havana City, Cuba

*E-mail: pedroramos@iift.cu

Received: *27 Jun 2010.* ***Published:*** *21 Sep 2010.*

Pineapple (*Ananas comosus*) is a common crop in tropical and subtropical areas of the world. Crop yields are seriously affected by mealybug wilt of pineapple (MWP), a viral disease with mealybugs (*Dysmicoccus* spp.) as vectors (Sether *et al*., 2005). Viruses associated with MWP are members of the genus *Ampelovirus*, family *Closteroviridae*. In Hawaii, *Pineapple mealybug wilt-associated virus*- (PMWaV-1) infection has been correlated with 5 to 15% of ratoon crop yield reduction and losses of up to 30% of production due to premature or asynchronous fruit ripeness. However, in that region, the most widespread virus species is PMWaV-2, which causes up to 100% fruit loss (Sether & Hu, 2002). Conversely, PMWaV-2 is uncommon in Australia, a country where MWP also causes major reduction of pineapple fruit yield. In Australia, MWP symptoms are strongly correlated with infections by PMWaV-3 alone or by both PMWaV-1 and -3 (Gambley *et al*., 2008). Due to the high nucleotide identity and the conserved genome organization between PMWaV-1 and PMWaV-3, it is considered that these two viruses have similar deleterious effects on either growth rate or pineapple fruit yield in Hawaii (Sether *et al*., 2005, 2009). Currently, there are 5,310 ha of pineapple orchards in Cuba, with annual fruit production that reached 28,908 tonnes in 2009. MWP disease is an economic problem for pineapple production in the island, causing up to 40% crop losses (Anonymous, 1989). PMWaV-2 was first detected in a diseased pineapple plant from Ciego de Avila in 1998, with molecular characterisation further provided by Borroto-Fernández *et al*., (2007).

During a survey for PMWaVs in 2009, thirty pineapple plants showing typical symptoms of MWP (foliar reddening, leaves with tips curved down and dieback) were collected in the Island of Youth, western region of the country (Fig. 1). Total RNA was extracted using the *TRIzol LS Reagent* kit (Invitrogen, Scotland, UK). RT-PCR assays for PMWaV-1, PMWaV-2 and PMWaV-3 detection were performed using the 225/226, 223/224 and 263/264 primer pairs, respectively; these amplify fragments corresponding to the HSP70h protein ORF of each viral species (Sether *et al*., 2005). Fragments of expected size for PMWaV-2 (c. 610 bp) and PMWaV-3 (c. 490 bp) were simultaneously amplified from seventeen plants with appropriate symptoms. Amplicons corresponding to PMWaV-1 were not obtained. DNA bands were purified, ligated to pGEM®-T Easy vector (Promega, Madison, USA) and two individual clones derived from each virus per infected plant were sequenced. PMWaV-3 derived amplicons shared ≥ 98% sequence identity with each other, and a representative sequence was deposited in GenBank (PMWaV-3 Cu, Accession No. GU563497). Sequence comparisons showed the closest nucleotide identity (98%) to PMWaV-3 from Hawaii (DQ399259). On the other hand, a representative sequence of PMWaV-2 Cu amplicons (FN825676) showed the closest nucleotide identity (99%) to PMWaV-2 from Taiwan (EU769115.1) and Thailand (EU016675.1). Phylogenetic analysis based on the PMWaV-3 amplicon sequence of Cuban and reference closteroviruses, grouped PMWaV-3 Cu and PMWaV-3 isolates from Hawaii and Thailand within the same phylogenetic cluster (Fig. 2). The phylogenetic tree also supported the sequence divergence of the cluster composed by PMWaV-3 and PMWaV-1 from that of PMWaV-2Hw, GLRaV-1 and GLRaV-3 (type member of the genus *Ampelovirus*) as previously observed (Sether *et al*., 2009). Gathering all these data, this is the first report of the presence of the PMWaV-3 in Cuban pineapple fields and in the Caribbean basin.

Noteworthy is that pineapple plants affected by MWP were infected by both PMWaV-3 and PMWaV-2 which suggests that a complex of ampeloviruses may be widespread in Cuban pineapple fields. Results support the need to implement certification procedures for pineapple propagation materials to reduce the economic impact of MWP disease on pineapple crops in Cuba.

References

Anonymous, 1989. Instructivo técnico para el cultivo de la piña. Ciudad de la Habana , Cuba:Ed. CIDA.

Borroto-Fernández EG, Torres-Accosta JA, Laimer M, 2007. RT-PCR detection and protein-protein interaction of viral components of *Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 in Cuba. Journal of Plant Pathology* **89**, 435-439.

Gambley CF, Steele V, Geering ADW, Thomas JE, 2008. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. *Australasian Plant Pathology* **37**, 95-105. [doi:10.1071/AP07096]

Sether DM, Hu JS, 2002. Yield impact and spread of *Pineapple mealybug wilt associated virus-2* and mealybug wilt of pineapple in Hawaii. *Plant Disease* **86**, 867-874. [doi:10.1094/PDIS.2002.86.8.867]

Sether DM, Melzer MJ, Borth WB, Hu JS, 2009. Genome organization and phylogenetic relationship of *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* with family Closteroviridae members. *Virus Genes* **38**, 414-420. [doi:10.1007/s11262-009-0334-5]

Sether DM, Melzer MJ, Busto J, Zee F, Hu JS, 2005. Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. *Plant Disease* **89** , 450-456. [doi:10.1094/PD-89-0450]

Figure 1

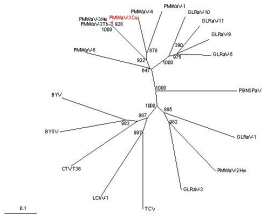


Figure 2

To cite this report: Hernández L, Ramos PL, Rodríguez M, Peña I, Pérez JM, 2010. First report of *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* infecting pineapple in Cuba. *New Disease Reports* **22**, 18. [doi:10.5197/j.2044-0588.2010.022.018]

©2010 The Authors

This report was published on-line at www.ndrs.org.uk where high quality versions of the figures can be found.

Notas Técnicas

La marchitez de la piña: una enfermedad asociada a virus

Lester Hernández-Rodríguez y Pedro Luis Ramos-González

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave. 7ma No. 3005 e/ 30 y 32. Miramar. Playa. La Habana. Cuba.
E-mail: lesterhernandez@iift.cu

Una de las principales limitaciones del cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) es su sensibilidad a la enfermedad conocida como *marchitez de la piña producida por cochinillas* (Rohrbach y Johnson, 2003; Sether *et al*., 2009). Sin embargo, es contradictorio el hecho de que el nombre de la enfermedad sea *marchitez de la piña producida por cochinillas* cuando se ha demostrado que su etiología está asociada a agentes virales. La causa probable radica en que en las descripciones iniciales de la enfermedad, los síntomas fueron asociados únicamente al daño producido por las cochinillas (Rohrbach *et al*., 1988).

Los primeros informes de dicha enfermedad datan del año 1912. En ellos se señalaba que su incidencia era limitada en algunas plantaciones de Hawai (Higgens, 1912). Sin embargo, en el año 1920, se describió la devastación de campos enteros y por primera vez se sugirió su relación con las cochinillas (Illingworth, 1931). Son los trabajos realizados por el investigador Walter Carter en la década de 1930, los que asociaron definitivamente a las cochinillas con la marchitez de la piña. Esta hipótesis se basó en la relación entre la cantidad de cochinillas en la plantación con la aparición de la enfermedad (Carter, 1933; 1935). Además, se obtenía un excelente control de la enfermedad con sólo reducir la población del insecto (Carter, 1939). De este modo, la consistente asociación de las cochinillas con la marchitez de la piña determinó que la enfermedad se reconozca hasta nuestros días como *marchitez de la piña producida por cochinillas*, y en inglés como *mealybug wilt of pineapple,* que es la frase de la cual se derivan las siglas MWP, con las que se cita esta enfermedad (Rohrbach *et al*., 1988; Gunashinge y German, 1989; Sether *et al*., 2010).

Sin embargo, las evidencias experimentales devenidas de la observación y el seguimiento de las plantaciones enfermas, hicieron dudar de la relación directa de las cochinillas con esta enfermedad. Aunque la marchitez de la piña estaba ampliamente ligada a la presencia de cochinillas, otras evidencias contradecían que la naturaleza exacta de la misma fueran estos insectos. Por citar algunos ejemplos, en plantaciones altamente infestadas por cochinillas del cultivar Cayena Lisa (variedad altamente susceptible) en Santo Domingo, México y Guyana, no se presentaba ningún síntoma de MWP. Tan pronto se introdujeron en la plantación cochinillas procedentes de plantas originadas en lugares donde existía la enfermedad, comenzaron a aparecer los síntomas. En otras regiones como Martinica y Baja Guinea, las plantaciones infestadas con cochinillas, estuvieron libres de marchitez hasta tanto no se introdujeron en ellas vástagos de regiones donde existía la enfermedad (Anónimo, 1963). En las plantaciones libres de MWP de estos países, se producía sólo un «cierto agotamiento» de las plantas de piña debido al parasitismo por las cochinillas, cuyos síntomas no tenían relación alguna con los descritos para la enfermedad (Py, 1968).

La detección de ARN de doble cadena (ARNdc) en plantas con síntomas de MWP fue la primera evidencia molecular de la asociación de un virus con dicha enfermedad. Estos hallazgos condujeron posteriormente al aislamiento y la caracterización de partículas virales en extractos de plantas enfermas de piña. Los resultados de la caracterización morfológica de las partículas virales, flexuosas y abiertas con longitudes de 1200-1500 nm x 12 nm, el patrón de electroforesis del ARN replicativo (ARNdc) y el peso molecular de la proteína de la cápside de aproximadamente 23 800 Da, ubicó al patógeno como un miembro de la familia Closteroviridae. Es por estas razones que se le nombró inicialmente *closterovirus de la piña* o PCV, sigla que se corresponde con el término en inglés *Pineapple closterovirus-like virions* (Gunashinge y German, 1989; Hu *et al*., 1996). Con posterioridad los virus se renombraron como *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 al -5 (acrónimos PMWaV-1 al -5), puesto que se han caracterizado cinco especies diferentes, las que

filogenéticamente se agrupan dentro del género Ampelovirus de la familia Closteroviridae (Gambley *et al*., 2008; Sether *et al*., 2009).

Existen pocos ejemplos de enfermedades en los cuales tengan que estar presentes tanto los agentes causales como los insectos vectores para que se expresen los síntomas (Sether y Hu., 2002a; Hernández y Peña, 2009). En el caso de la marchitez de la piña se ha demostrado que no basta con que el virus esté en la planta enferma, sino que es necesario, para la expresión de los síntomas, que las cochinillas estén alimentándose sobre la planta (Sether y Hu 2002a).

En la literatura especializada también existen elementos contradictorios en cuanto a las especies virales que se relacionan directamente con la inducción de los síntomas de MWP. En Hawai, la enfermedad de la marchitez de la piña es inducida por PMWaV-2, pero no por PMWaV-1, PMWaV-3 o una combinación de ambos (Sether *et al*., 2002a). En trabajos realizados con plantas de piña que sólo estaban infectadas con PMWaV-1, su rendimiento se redujo considerablemente, pero no desarrollaron síntomas de MWP. Por otra parte, en las plantas con infecciones mixtas con los virus 1 y 2, o sólo el 2, si se desarrollaron los síntomas típicos de la enfermedad (Sether y Hu, 2002b). En cambio, en estudios similares realizados en Australia, se encontró una alta correlación entre el desarrollo de la enfermedad y la presencia de PMWaV-3, o una mezcla de PMWaV-1 y PMWaV-3 A su vez, se observó una baja asociación de la enfermedad con la infección por PMWaV-2 (Gambley *et al*., 2008). Esta diferencia en la etiología de la enfermedad entre los grupos PMWaV-2 y PMWaV-3 sugiere una fuerte distinción entre estas dos especies de PMWaVs o incluso, pudiera reflejar la existencia de cepas diferentes de PMWaV-2 (Sether *et al*., 2009).

El cultivo de la piña proporciona un uso ecológico apropiado del suelo en las zonas donde se cultiva y es una actividad agrícola de importancia económica para diferentes comunidades en Cuba y en el mundo. Sin embargo, el impacto de la enfermedad de la marchitez de la piña ha llegado a significar pérdidas desde un 25 a un 100% de las cosechas (Sether y Hu, 2002b). En Cuba en particular, las pérdidas han alcanzado cifras de hasta un 40% (Anónimo, 1989). Por estas razones, las medidas para el manejo de la enfermedad MWP, tanto aquellas que puedan eliminar o minimizar la fuente de virus en las plantaciones, como las relacionadas con el control del insecto vector, deben ser extremas para garantizar la sostenibilidad del cultivo de la reina de las frutas.

BIBLIOGRAFÍA

Anónimo. 1963. Travaux de recherches sur ananas. R. A. IFAC.

Anónimo. 1989. Instructivo técnico para el cultivo de la piña. Ed. CIDA, La Habana, Cuba.

Carter, W. 1933. The pineapple mealybug, *Pseudococcus brevipes*, and wilt of pineapples. *Phytopathology* 23: 207-242.

Carter, W. 1935. Studies on the biological control of *Pseudococcus brevipes* (Ckl.) in Jamaica and Central America. *Journal Econ. Entomol*. 28:1037-1041.

Carter, W. 1939. Injuries to plants caused by insect toxins. *Bot. Rev*. 5: 273-326.

Gambley C. F., Steele V., Geering A. D. W., Thomas J. E., 2008b. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. *Australas Plant Pathol.* 37: 95- 105.

Gunasinghe, U. B. y German, T. L. 1989. Purification and Partial Characterization of a virus from pineapple. *Phytopathology.* 79: 1337-1341.

Hernández, L. e I. Peña. 2009. La marchitez de la piña producida por cochinillas, ¿un problema complejo o un complejo de problemas? *Citrifrut.* 26 (1): 22-28.

Higgens, J. E. 1912. The pineapple in Hawai. *Hawai Stn. Press. Bull.* 36:1-34.

Hu, J. S.; D. M.Sether y D. E.Ullman. 1996. Detection of pineapple plants and mealybug using monoclonal antibodies. *Plant Pathol*. 45: 829-836.

Illingworth, J. F. 1931. Preliminary report on evidence that mealybugs are an important factor in mealybug wilt. *Journal Econ. Entomol*. 24: 877-899.

Melzer, M. J.; Karasev, A. V.; Sether, D. M. y Hu, J. S. 2001. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of *Pineapple mealybug wilt associated virus-2*. *Journal of General Virology.* 82: 1-7.

Melzer, M. J.; D. M.Sether; A. V.Karasev; W. Borth; J. S.Hu. 2008. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pineapple mealybug wilt- associated virus-1*. *Arch Virol*. 153: 707-714.

Py, C. 1968. La Piña. Colección: Técnicas agrícolas y producciones tropicales. Ed. Revolucionarias.: 245 pp.

Rohrbach, K. G.; J. W.Beardsley ; T. L.German; N. J. Reinier y W. G. Sanford. 1988. Mealybug wilt, mealybugs, and ants on pineapple. *Plant Dis*. 72: 558-565.

Rohrbach, K. y M. Johnson. 2003. Pest, diseases and weeds. En Bartholomew, D.; R. E.Paull; K. G. Rohrbach (eds.). The Pineapple Botany, Production and Uses, Vol. 301. *Wallingford: CABI Publishing*. pp 503-509.

Sether, D. M. y J. S. Hu. 2002a. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology* 92: 928-935.

Sether, D. M. y J. S. Hu. 2002b. Yield impact y spread of *Pineapple mealybug wilt associated virus-2* and mealybug wilt of pineapple in Hawaii. *Plant Dis*. 86:867-874.

Sether, D. M.; M. J. Mezler; W. B. Borth; J. S. Hu. 2009. Genome organization phylogenetic relationship of *Pineapple mealibug wilt associated virus- 3* with family *Closteroviridae. Virus Genes*. 38:414-420.

Sether, D. M.; M. J. Melzer; J. Busto; F. Zee y Hu. 2005. Diversity and mealybug transmissibility of Ampelovirus in pineapple. *Plant Dis*. 89:450-456.

Sether, D. M.; W. B. Borth; M. J. Melzer y J. S. Hu. Spatial and temporal incidences of pineapple mealybug wilt-associated viruses in pineapple planting blocks. *Plant Disease.* 94 (2): 196-200.

CitriFrut 30(2) jul-dic: 43-54. 2013
ISSN: 1607-5072

Artículo científico

DISTRIBUCIÓN DE LA ENFERMEDAD MARCHITEZ DE LA PIÑA (*Ananas comosus* (L.) MERR.) EN PLANTACIONES COMERCIALES DE CUBA*

Lester Hernández-Rodríguez, Pedro Ramos-González; Gabriel García-García; Victoria Zamora- Rodríguez; Inés Peña-Bárzaga; Juana María Pérez- Castro; Xenia Ferriol- Marchena

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave. 7ma. No. 3005 entre 30 y 32, Miramar, Playa. La Habana. Cuba.
E-mail: fitopatologia@iift.cu

* Recibido: 19 de diciembre de 2012. Aceptado: 12 de julio de 2013

RESUMEN
La marchitez de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) es una de las enfermedades más destructivas que afecta a este cultivo en todo el mundo. Su etiología se ha asociado a cinco virus denominados *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 al -5 (PMWaV-1 al -5) (*Closteroviridae, Ampelovirus)*. En Cuba, esta enfermedad ocasiona pérdidas estimadas en el 40 % de las cosechas y sólo se ha detectado PMWaV-2 en la provincia de Ciego de Ávila, en el año 2007 y PMWaV-3, en la Isla de la Juventud, en el 2010. Por ello, se realizó una prospección en plantaciones de 12 provincias a lo largo del país con el objetivo de conocer el comportamiento de los síntomas de la enfermedad y su distribución en las áreas comerciales. En todas las áreas visitadas se observaron síntomas de enrojecimiento foliar, necrosis y curvatura hacia abajo de las hojas y marchitez, considerados característicos de la enfermedad marchitez de la piña. La inducción de los síntomas en los cultivares Española Roja y Cayena Lisa es muy similar en las condiciones de Cuba a los informados en otros países, pero difieren del cv. MD2. Se encontraron valores de prevalencia de plantas con síntomas de marchitez que variaron entre el 0 y el 100 %. En este trabajo se demuestra la distribución de la enfermedad de la marchitez de la piña por la isla de Cuba, y se sugiere el rol determinante del intercambio de material de propagación no certificado como la principal causa de la amplia diseminación encontrada. En su conjunto, los resultados indican la necesidad de la implementación de un sistema de producción de material de propagación certificado para el cultivo de la piña que sea la base de la estrategia de manejo de la enfermedad en Cuba.

Palabras clave: prospección de la enfermedad marchitez de la piña, piña, cochinillas, *Ampelovirus*

Distribution of mealybug wilt of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) disease in commercial fields of Cuba

ABSTRACT
Mealybug wilt of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) is a devastating viral disease found in all the major pineapple production regions of the world. The etiology of the disease is associated to five ampelovirus named Pineapple mealybug wilt-associated virus-1 to -5 (PMWaV-1 to -5) (*Closteroviridae, Ampelovirus*). In Cuba, the disease has been associated to crop losses around 40 % of yields and PMWaV-2 was detected in the province of Ciego de Ávila, in 2007, and PMWaV-3, in Isla de la Juventud, in 2010. A survey throughout 12 provinces of Cuba was conducted with the objective to study the behavior of wilt pineapple symptoms in the country and its distribution in the commercial plantations. Symptoms of foliar reddening, severe tip dieback, and leaf wilting, considered characteristic of the disease, were observed in all the visited areas. The induction of the symptoms was similar in the cultivars Red Spanish and Smooth Cayenne, but they differed from that of the cv. MD2. The prevalence of plants with mealybug wilt disease symptoms varied between the 0 and 100 %. This paper shows the wide distribution of the mealybug wilt disease in the island of Cuba, and the interchange of sanitary uncertified propagation material as one of the main causes of the spread. Together, the results advice the need of the implementation of a system for the production of sanitary certified propagation material of pineapple as the basis of management strategy for the disease in Cuba.

Key words: mealybug wilt of pineapple disease exploration, pineapple, mealybug, *Ampelovirus*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad marchitez de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) producida por cochinillas, es una de las principales limitaciones de la producción de este frutal en el mundo (Singhe y Sastry, 1974; Wakman *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1997; Hughes y Samita, 1998; Borroto *et al.*, 1998, 2007; Sether y Hu, 2002a; y Shen, 2009). La enfermedad, nombrada comúnmente por la frase en inglés mealybug wilt of pineapple (MWP), se informó por primera vez a principios del siglo XX (Rohrbach *et al.*, 1988; 2003).

La MWP produce una depauperación gradual de la planta que culmina con la muerte de la misma. Los síntomas más característicos son el enrojecimiento y bronceado de las hojas, la pérdida de turgencia, muerte foliar regresiva y reducción de la masa radicular (Sether *et al.*, 2002a). Por otra parte, ocurren cambios en los ciclos de fructificación del vegetal y disminuye el calibre de los frutos, los que aumentan su acidez y su consistencia fibrosa hasta perder su valor comercial (Nieves *et al.*, 1996; Sether *et al.*, 2002b).

New Disease Reports

First report of *Pineapple bacilliform comosus virus* (PBCoV) and *endogenous Pineapple pararetrovirus*-1 (ePPRV-1) in pineapple plants in Cuba

L. Hernandez-Rodriguez [1]*, P.L. Ramos-Gonzalez [1], G. Garcia-Garcia [1], E. Javer Higginson [2] and V. Zamora-Rodriguez [1]

[1] *Research Institute on Tropical Fruit Crops, P.O. Box 11 300, 7th Ave., # 3005, Playa, Havana City, Cuba*; [2] *National Research Institute for Plant Health, Ave. 110, # 514, Corner 5taB, Playa, Havana City, Cuba*

*E-mail: fitopatologia@iift.cu

Received: *28 Feb 2013.* ***Published:*** *04 Aug 2013.*

Mealybug wilt of pineapple (MWP) is considered one of the most destructive diseases of pineapple (*Ananas comosus*) crops worldwide. MWP have been related to five species of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 to 5 (PMWaV-1 to 5) (Closteroviridae: *Ampelovirus*), but an interaction with badnaviruses (Caulimoviridae: *Badnavirus*) has not been completely discarded (Sether *et al*., 2012). In Cuba, where MWP has been associated with 40% of crop losses, only PMWaV-2 and PMWaV-3 have been detected (Borroto *et al*., 2007; Hernandez *et al*., 2010a, b), and there is no evidence of badnavirus presence in the country. During a survey for badnaviruses infecting pineapple cv. Red Spanish in commercial fields in 2009-2011, 78 pineapple plants showing MWP symptoms (foliar reddening, leaves with tips curved down and dieback) were collected for further testing. Two pineapple plants cv. Red Spanish derived from *in vitro* apical meristem tissue culture were selected as negative controls for the PCR assays. Total nucleic acid was extracted from leaf samples according to Murray & Thompson (1980) and badnavirus sequences were amplified in PCR assays using the Badna-1A/Badna 4 degenerate primers as described (Gambley *et al*., 2008).

Fragments of the expected size (ca. 544 bp) were amplified from DNA extracts from forty symptom-bearing plants. However, PCR products of the same size were also obtained when DNA extracts from the two *in vitro* cultured plants (BCuL30 and BCuL31) were tested. Amplicons from the extracts of these two plants and from four randomly chosen MWP symptom-bearing plants (BCuL26 to 29) were selected for further characterisation. DNA fragments were gel-purified, cloned and four individual clones per infected plant sample were sequenced. Six sequences of 540 nt were recovered and showed nucleotides identities that ranged from 52.2 to 93.5% (Table 1), except for BCuLE30 and BCuLE31 that were identical to each other. BCuL26 to BCuL29 sequences were deposited in GenBank (Accession Nos. JQ390618 to JQ390621) and showed at least 80.1% nucleotide identity with *Pineapple bacillliform comosus virus* (PBCoV-Au) isolated in Australia (EU377664). On the other hand, the sequence of the amplicons isolated from BCuLE30 and BCuLE31 (JQ390622) showed nucleotide identities between 91.7 and 95.6% with isolates of *endogenous Pineapple pararetrovirus*-1 (ePPRV-1) from Australia and Hawaii (EU377674 and GQ395780). The obtained sequences confirmed the presence of PBCoV and ePPRV-1 in pineapples from Cuba. Phylogenetic analysis grouped BCuL26 to BCuL29 sequences and PBCoV within the same phylogenetic cluster, while BCuL30 grouped in an individual branch with ePPRV-1 supporting the previous results (Fig. 1). This is the first report of the PBCoV and ePPRV-1 presence in the Caribbean basin, results that highlight the need to implement certification procedures for the propagation material to reduce the risk of viral diseases affecting pineapple crop.

Acknowledgements

This research was supported in part by the grant C/5032-1 conceded to L. Hernandez-Rodriguez by the International Foundation for Science, Sweden.

References

Borroto-Fernández EG, Torres-Accosta JA, Laimer M, 2007. RT-PCR detection and protein-protein interaction of viral components of *Pineapple mealybug wilt-associated virus 2* in Cuba. *Journal of Plant Pathology* **89**, 435-439.

Gambley CF, Geering ADW, Steele V, Thomas JE, 2008. Identification of viral and non-viral reverse transcribing elements in pineapple (*Ananas comosus*), including two new badnavirus species. *Archive of Virology.* **153**, 1599-1604. [http://dx.doi.org/10.1007/s00705-008-0160-4]

Hernández L, Ramos PL, Rodríguez M, Peña I, Pérez JM, 2010a. First report of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 infecting pineapple in Cuba. *New Disease Reports* **22**, 18. [http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2010.022.018]

Hernández L, Ramos PL, Rodríguez M, Zamora V, Peña I, Pérez, JM, 2010b. Detección de ampelovirus asociados a la enfermedad de la marchitez de la piña (Ananas comosus (L.) Merr.) en la Isla de la Juventud, Cuba . [Detection of ampeloviruses associated to the mealybug wilt of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) disease in the Island of Youth, Cuba.] *Revista CitriFrut* **27**, 39-46.

Murray MG, Thompson WF, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**, 4321-4325. [http://dx.doi.org/10.1093/nar/8.19.4321]

Sether DM, Melzer MJ, Borth WB, Hu JS, 2012. Pineapple bacilliform CO virus: Diversity, detection, distribution, and transmission. *Plant Disease* **96**, 1798-1804. [http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0718-RE]

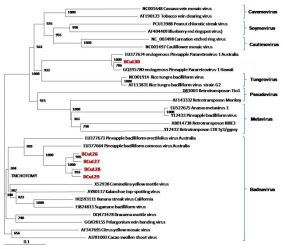


Figure 1

Table 1. Nucleotide identity percentages obtained by the comparison of badna1A/badna4 amplicon sequences recovered from DNA extracts of Cuban pineapples (BCuL26 to 30) and the homologue sequences of PBCoV-Au and *Pineapple bacilliform erectifolius virus* (PBErV) and ePPRV-1.

Virus isolate	BCuL26	BCuL27	BCuL28	BCuL29	BCuL30	PBCoV-Au	PBErV-Au	ePPRV-1-Au
BCuL27	93,5							
BCuL28	93,2	88,8						
BCuL29	91,2	90,5	91,8					
BCuL30	58,5	55,7	56,9	55,2				
PBCoV-Au	81,3	81,8	81,8	80,7	54,7			
PBErV-Au	73,2	72,1	72,5	72,3	52,7	71,5		
ePPRV-1-Au	56,8	56,2	54,0	54,8	95,6	55,0	53,5	
ePPRV-1-Hw	57,0	56,8	55,2	56,3	91,7	55,5	52,7	94,6

Figure 2

To cite this report: Hernandez-Rodriguez L, Ramos-Gonzalez PL, Garcia-Garcia G, Javer Higginson E, Zamora-Rodriguez V, 2013. First report of *Pineapple bacilliform comosus virus* (PBCoV) and *endogenous Pineapple pararetrovirus*-1 (ePPRV-1) in pineapple plants in Cuba. *New Disease Reports* **28**, 2. [http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2013.028.002]

©2013 The Authors *This report was published on-line at www.ndrs.org.uk where high quality versions of the figures can be found.*

Crop Protection 65 (2014) 43–50

Contents lists available at ScienceDirect

Crop Protection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cropro

Geographic distribution of mealybug wilt disease of pineapple and genetic diversity of viruses infecting pineapple in Cuba

L. Hernandez-Rodriguez*, P.L. Ramos-Gonzalez [1], G. Garcia-Garcia, V. Zamora, A.M. Peralta-Martin, I. Peña, J.M. Perez, X. Ferriol

Research Institute on Tropical Fruit Crops, 7th Ave. # 3005, P.O. Box 11 300, Playa, Havana, Cuba

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 February 2014
Received in revised form
30 June 2014
Accepted 1 July 2014
Available online

Keywords:
Plant viruses
Pineapple
Mealybug wilt of pineapple
Ampeloviruses
Badnaviruses
Molecular characterization

ABSTRACT

Several species of ampeloviruses and badnaviruses infect pineapple plants around the world. *Pineapple mealybug wilt-associated* ampeloviruses have been associated with mealybug wilt of pineapple (MWP), the major viral disease threatening this crop. Conversely, infection by the badnaviruses Pineapple bacilliform comosus virus (PBCOV) and Pineapple bacilliform erectifolius virus (PBERV) is asymptomatic. To investigate the status of infection of the pineapple crop in Cuba, a diagnostic survey was developed in commercial areas during the period 2009–2012. Incidence of MWP disease was found in up to 100% of the plants in some fields of Central and Eastern regions of the island. Molecular assays revealed the presence of PMWaV-1 for the first time in the Caribbean basin and PMWaV-2, PMWaV-3, either as mixed infections or in combination with PBCOV throughout the country. Furthermore, they revealed for the first time the presence of PMWaV-2 in *Bromelia pinguin* L., a plant commonly used in Cuba as hedgerow. Sequence analysis of partial *heat shock protein 70h* and complete *coat protein* gene of Cuban isolates of PMWaV-1, -2 and -3 showed nucleotide identities above 97% with cognate sequences of viruses isolated from other countries. This work discloses the presence of a complex of viruses associated with the pineapple crop in Cuba, highlights the potential role of *B. pinguin* in the PMWaV-mealybug-pineapple pathosystem and makes available diagnostic tools for the detection of viruses affecting pineapple for a seed certified production system in Cuba.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mealybug wilt of pineapple (MWP) is a devastating disease of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) and is currently present in the major pineapple-growing areas of the world (Sether et al., 2010). Disease symptoms include severe tip dieback, leaf reddening, downward curling along the leaf margins and dieback, and wilting of symptomatic leaves, all of them related to a reduced root system size (Sether and Hu, 2002a).

Although MWP etiology is not thoroughly understood, *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 (PMWaV-1), PMWaV-2 and PMWaV-3 (genus *Ampelovirus*, family *Closteroviridae*) have been identified as the fundamental viral pathogens (Gambley et al., 2008a). In Hawaii, MWP symptoms are caused by the simultaneous presence of PMWaV-2 and mealybugs, but the combination of mealybugs with either PMWaV-1 or PMWaV-3 does not elicit the disease (Sether and Hu, 2002a). On the contrary, in Australia PMWaV-2 is not responsible for 100% of plants showing MWP, suggesting that either other PMWaV species, different strains of PMWaV-2, or additional factors may be involved in the observed symptoms (Gambley et al., 2008a).

Pineapple bacilliform comosus virus (PBCOV) and Pineapple bacilliform erectifolius virus (PBERV) (tentative members of the genus *Badnavirus*, family *Caulimoviridae*) have also been identified in pineapple, but their infections are asymptomatic (Gambley et al., 2008b; Sether et al., 2012). PBCOV has been detected in pineapples from Hawaii, Australia and China, and PBERV has been only identified in pineapples from Australia (Gambley et al., 2008b; Wu et al., 2010; Sether et al., 2012). Although PBCOV and PBERV are not directly involved with MWP, interactions of badnaviruses with the disease cannot be ruled out, considering the experience of badnavirus diseases in other crops (Sether and Hu, 2002a).

* Corresponding author. Ave. 7ma. No. 3005 e/30 y 32, Miramar, Playa, Havana, Cuba. Tel.: +53 209 3585; fax: +53 7 204 6794.
E-mail address: fitopatologia@iift.cu (L. Hernandez-Rodriguez).
[1] Current address: Centro de Citricultura Sylvio Moreira, IAC, Caixa Postal 04 13490-970, Cordeiropolis, Sao Paulo (SP), Brazil.

http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.07.003
0261-2194/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Author's Personal Copy

Journal of Virological Methods 237 (2016) 14–17

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection

Ana Arruabarrena[a,*], María José Benítez-Galeano[b], Mario Giambiasi[a], Ana Bertalmío[a], Rodney Colina[b], Lester Hernández-Rodríguez[c]

[a] Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, CP 50000, Salto, Uruguay
[b] Laboratorio de Virología Molecular, Centro Universitario Regional Noroeste (CENUR Noroeste), Universidad de la República, Rivera 1350, 50000, Salto, Uruguay
[c] Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, 7th Ave. #3005, CP 11300, Playa, La Habana, Cuba

Article history:
Received 30 May 2016
Received in revised form 26 July 2016
Accepted 14 August 2016
Available online 16 August 2016

Keywords:
DNA
RNA
Plant virus
Plant viroid
Purification
PCR
RT-PCR
qPCR

A B S T R A C T

Standard molecular methods for plant virus diagnosis require the purification of RNA or DNA extracts from a large number of samples, with sufficient concentration and quality for their use in PCR, RT-PCR, or qPCR analysis. Most methods are laborious and use either hazardous and/or costly chemicals. A previously published protocol for RNA isolation from several plant species yields high amounts of good quality RNA-DNA mixture in a simple, safe and inexpensive manner. In the present work, this method was tested to obtain RNA-DNA extracts from leaves of tomato, potato and three species of citrus, and was compared with two commercial kits. The results demonstrated that this protocol offers at least comparable nucleic acid quality, quantity and purity to those provided by commercial phenol-based or spin column systems and that are suitable to be used in PCR, RT-PCR and qPCR for virus and viroid detection. Because of its easy implementation and the use of safe and inexpensive reagents, it can be easily implemented to work in plant virus and viroid detection in different plant species.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Viruses and viroids are responsible for considerable losses in yield and also decrease plant and fruit quality in several cultivated crops worldwide (Yadav and Khurana, 2016). As these pathogens cannot be controlled using physical or chemical methods, preventive measures to avoid propagation of contaminated material are of highest importance in the context of an integrated control approach. The first critical step in controlling viral or virus-like diseases is to accurately detect the virus or viroid presence in the plants (López et al., 2003, 2009; Ramos-González et al., 2011). In many cases, plants displaying symptoms in the field can be infected with more than one pathogen and, consequently, it is needed to determine all the viruses and/or viroids involved in the infection and associated symptoms. Therefore, plant viral disease diagnosis often requires the detection of more than one virus in a single plant including DNA viruses, RNA viruses, and viroids (López et al., 2003). When DNA and RNA viruses need to be detected, standard methods require the purification of both nucleic acids separately. Most standard DNA and RNA isolation protocols are laborious and employ organic solvents and/or hazardous and expensive chemicals. In addition, when a large number of samples are handled, traditional protocols are very time-consuming. Available protocols and commercial kits or reagents for DNA or RNA isolation commonly use phenol, guanidinium thiocyanate and/or β-mercaptoethanol based solutions, highly toxic and harmful reagents (Sambrook et al., 1989).

Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa published a DNA-free RNA isolation protocol for *Arabidopsis* that uses low pH non-toxic aqueous reagents and is simple, efficient and inexpensive (Oñate-Sánchez and Vicente-Carbajosa, 2008). This protocol was later validated for isolating RNA from other plant species (tomato and wheat) (Couto et al., 2015). The original protocol was intended to be used in gene expression analysis experiments using RT-PCR or real time-PCR. However, with minor modifications, the protocol can be adapted to isolate good quality RNA and DNA simultaneously if no DNAse treatment is performed. In this work, an adaptation of Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa protocol, referred as Low pH method (supplemental material 1) or method 1, was used to simultaneously isolate DNA and RNA from tissues of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), potato (*Solanum tuberosum* L.), 'Pineapple' sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), Mexican lime (*C. aurantifolia*

* Corresponding author.
E-mail address: aarruabarrena@inia.org.uy (A. Arruabarrena).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.011
0166-0934/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Centro Agrícola
http://cagricola.uclv.edu.cu

Vol.44, No.2, abril-junio, 52-60, 2017
CE: 4516 CF: cag072172123

Revista Centro Agrícola
Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas
ISSN papel: 0253-5785 ISSN on line: 2072-2001

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Infección de *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1*, *2* y *3* en plantas de piña, híbrido 'MD-2' en Ciego de Ávila

Pineapple mealybug wilt-associated virus 1, *2* and *3* infection, in pineapples hybrid 'MD-2' in Ciego de Ávila

Lester Hernández-Rodríguez[1], Lelurlys Nápoles Borrero[2], Luis Pérez Vicente[3], Oscar Vitalio Concepción Laffitte[2], Mariela Cid Ruiz[2], Yilian Alvares Llanes[1], Victoria Zamora Rodríguez[1]

[1]*Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, Ave. 7ma No. 3005 e/30 y 32, Playa, La Habana, Cuba. CP 11300*

[2]*Centro de Bioplantas, UNICA. Carretera a Morón, km 9, Ciego de Ávila, Cuba. CP 69450*

[3]*Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 # 514 Esq. 5ta B, Playa, La Habana, Cuba. CP 11300*

E-mail: fitopatología@iift.cu; lesterHernándeziift@gmail.com

RESUMEN

La etiología de la enfermedad marchitez de la piña (MWP) está asociada a un complejo de ampelovirus (*Closteroviridae*) nombrados *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 1 al 5 (PMWaV-1 al -5). Los objetivos de este estudio fueron determinar la especie de PMWaVs asociada con los síntomas de MWP en plantas de piña, híbrido 'MD-2', y la presencia de estos virus en vitroplantas obtenidas a partir de coronas asintomáticas de este mismo cultivar. Se colectaron seis plantas con síntomas de MWP y 25 coronas asintomáticas en plantaciones comerciales de piña, híbrido 'MD-2', de Ciego de Ávila, durante el periodo 2010-2015. Las coronas se utilizaron como explantes para producir plantas "*in vitro*". A cada planta se le extrajeron los ARN para detectar PMWaV-1, -2 y -3 mediante RT-PCR. Cinco de las seis plantas con síntomas de MWP contuvieron PMWaV-2, de las cuales cuatro estuvieron co-infectadas con PMWaV-1 y/o PMWaV-3. De las 25 plantas "*in vitro*" obtenidas, el 40 % contuvo la infección, al menos por un PMWaV, el 16 % por las tres especies virales, el 8 % por dos especies y el 16 % por un virus. La incidencia de PMWaVs en todas las muestras fueron de 38,7 % para PMWaV-1 y PMWaV-3 (12/31), y 32,3 % para PMWaV-2 (10/31). En su conjunto, los resultados evidencian la necesidad de certificar el estado sanitario del material de propagación de piña.

Palabras clave: ampelovirus, marchitez, piña, PMWaV-1, PMWaV-2, RT-PCR, virus de plantas

ABSTRACT

The etiology of the mealybug wit of pineapple (MWP) disease is associated with a complex of ampeloviruses (*Closteroviridae*) named *Pineapple mealybug wilt-associated virus* -1 to -5 (PMWaV-1 to -5). The aims of this study were to determine the specie of PMWaVs associated with MWP

43º CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA
Cuiabá 2010

FITOPATOLOGIA NO AGRONEGÓCIO

MATO GROSSO

Certificamos que

Hernandez, L.; Rodriguez, D.; Rubial, M.; Peña, I.; Zamora, V.; Perez, J. M.; Ramos, P. L., apresentaram o trabalho científico 04.110 - ***La marchitez de la piña en Cuba: distribución y caracterización de los virus asociados.,*** *na Sessão de Poster 04 - Epidemiologia, apresentada no dia 16 de Agosto de 2010, durante 43º. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, realizado no período de 15 a 19 de Agosto de 2010.*

Cuiabá, 19 de Agosto de 2010

Luiz Gonzaga Chitarra
Presidente do 43° Congresso Brasileiro de Fitopatologia

PROMOÇÃO REALIZAÇÃO PATROCÍNIO APOIO AGÊNCIA ORGANIZAÇÃO

Ministerio de la Agricultura

GEF
GRUPO EMPRESARIAL FRUTICOLA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FRUTICULTURA TROPICAL

MINISTERIO DE LA AGRICULTURA

Grupo Empresarial Frutícola

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical

III Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical

FRUTICULTURA 2010

CERTIFICADO

Se otorga a: Lester Hernández, Pedro L. Ramos, Inés Peña, Maylin Rodríguez, Gabriel García, Victoria Zamora, Juana M. Pérez, Dorys Hernández, Jorge L. Tapia, Alexander Banguela, Caridad González, Xenia Ferriol y Kristoffer Mejías

por su participación como:

☐ ***Conferencia Magistral*** ☒ ***Ponente*** ☐ ***Participante***

☐ ***Auspiciador*** ☐ ***Comité Organizador***

Dado en La Habana a los 30 días del mes de octubre de 2010

Arisbel Ferro Barrios
Directora General
GEF

Raixa E. Llauger Riverón
Directora General
IIFT

Grupo Empresarial Frutícola

DIRECCIÓN GENERAL
MINAG

El Comité Organizador del IX Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal otorga el presente:

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

A: **L. Hernández*, P. L. Ramos, I. Peña, M. Rubial, J. M. Pérez**

Primer informe de la presencia de *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* 3 *en* plantas de piña en Cuba

En calidad de: ■ _x_ Conferencista

■ ___ Participante

Dado en la ciudad de Santa Clara a los 22 días de abril de 2010

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LAS PLANTAS

Dr. C. Daniel Agramonte Peñalver
Presidente del Comité Organizador

CENSA

Seminario Internacional Sanidad Agropecuaria

Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria
International Seminar for Animal and Plant Health

Certificado / Certificate

A/To: L. Hernández-Rodríguez, P.L. Ramos-González, G. García-García, I. Peña-Barzaga, V. Zamora, J.M. Pérez, D. Hernández, J.L. Tapia

Por contribuir con su presencia como/For contributing with your presence as:

- ☒ Delegado/Delegate
- ☐ Expositor/Expositor
- ☐ Invitado/ Guest
- ☐ Acompañante/Accompanying person

En las actividades científicas del Seminario realizadas en la Habana, Cuba, del 3 al 6 de mayo de 2011.
For your participation in the scientific activities of the Seminar held in Havana, Cuba, on may 3er-6th, 2011.

Título/Title: Distribución de *Pineapple Mealybug Wilt-Associated Virus*-1 en el cultivo de la piña en Cuba

- ☐ Conferencia Plenaria/ Plenary Lecture
- ☐ Presentación Oral/Oral Presentation
- ☐ Conferencia Magistral/ Master Lecture
- ☒ Cartel/ Poster
- ☐ Mesa Redonda/Round Table

Dra. Oriela Pino
Secretaria Científica
Scientific Secretary

Dra. Lydia M. Tablada
Presidente del Comité Organizador
President of the Organizing Committee

Dra. Odalys Uffo
Secretaria Ejecutiva
Executive Secretary

BIOTECNOLOGÍA
HABANA 2011
DEL 28 DE NOVIEMBRE AL 3 DE DICIEMBRE

AGRO-BIOTECNOLOGÍA: CONTRIBUYENDO A ENFRENTAR LOS RETOS GLOBALES

AG-BIOTECH: CONTRIBUTING TO FACE GLOBAL CHALLENGES

El comité organizador otorga el presente

CERTIFICADO AL TRABAJO

Título: **Diversidad de virus asociados a la enfermedad Marchitez de la Piña en Cuba**

Autor: Lester Hernández Rodríguez, Pedro Luis Ramos González, Maylin Rodríguez Rubial, Gabriel García García, Victoria Zamora Rodríguez, Inés Peña Barzaga, Juana María Pérez

Dado en la Ciudad de La Habana a los 28 días del mes de Noviembre del 2011.

Dr. Mario Pablo. Estrada
Secretario Científico

Dr. Carlos Borroto
Presidente del Comité Organizador

Sociedad Cubana de Química

QUIMICUBA'2012

VIII CONGRESO INTERNACIONAL DE QUIMICA, INGENIERIA QUIMICA Y BIOQUIMICA

8TH INTERNATIONAL CONGRESS ON CHEMISTRY, CHEMICAL ENGINEERING AND BIOCHEMISTRY

LA HABANA/HAVANA, CUBA, OCTUBRE/OCTOBER, 9-12, 2012
HOTEL MELIA HABANA

La Sociedad Cubana de Química (SCQ) y el Comité Organizador se complacen en reconocer a: Lester Hernández Rodríguez

por su participación en el *VIII Congreso Internacional de Química, Ingeniería Química y Bioquímica de la SCQ*, que se efectuó del 9 al 12 de octubre del 2012 en las instalaciones del Hotel Meliá-Habana, La Habana, Cuba, con el trabajo titulado:

Diversidad viral asociada al cultivo de la piña (Ananas comosus L. Merr.) en Cuba

Presentado en la temática:

___ QUÍMICA: ENSEÑANZA E HISTORIA
___ QUÍMICA: ORGÁNICA
___ QUÍMICA: INORGÁNICA Y ANALÍTICA
___ QUÍMICA: FÍSICA Y COMPUTACIONAL
___ QUÍMICA: MATERIALES Y NANOCIENCIAS
___ QUÍMICA: INDUSTRIAL, INGENIERÍA Y AMBIENTAL
___ QUÍMICA: PRODUCTOS NATURALES, MEDICINAL y FARMACÉUTICA
X SIMPOSIO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

En la condición de:

Delegado ___ Conferencista ___ Presentación Oral X Póster ____

Participante ___ Acompañante ____

Secretario Científico de la Temática
Sociedad Cubana de Química

MINAG
MINISTERIO DE LA AGRICULTURA

GEF
GRUPO EMPRESARIAL
FRUTICOLA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FRUTICULTURA TROPICAL

IV Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical

FRUTICULTURA 2013

CERTIFICADO

Se otorga a:

LOSTER HERNÁNDEZ, PEDRO L. RAMOS, GABRIEL GARCÍA, VICTORIA ZAMORA, INÉS PEÑA, JUANA M. PÉREZ, ALBA PERALTA, XENIA FERRIOL, LÁZARO MIERES, KRISTOFFER MEJÍAS, DENY DAVID MORALES

por su participación como:

☐ **Conferencia Magistral** ☒ **Ponente** ☐ **Participante**
☐ **Auspiciador** ☐ **Comité Organizador**

La enfermedad marchitez de la piña en Cuba: evidencia de la necesidad de un sistema de producción de material certificado para garantizar la sostenibilidad del cultivo de este frutal en el país

Dado en Mayabeque a los 28 días del mes de junio de 2013

Arisbel Ferro Barrios
Directora General
GEF

Raixa E. Llauger Riverón
Directora General
IIFT

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FRUTICULTURA TROPICAL
MINAG
DIRECTORA
CALIDAD

VII SEMINARIO INTERNACIONAL DE SANIDAD VEGETAL

El Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal

otorga el presente

Certificado

A: Lester Hernández Rguez, P. S. Ramos Glez, V. Zamora Rguez, I. Peña Barzaga, J. H. Pérez Castro, J. Ferrol Marchena, S. Rubio Fontanills.

Por su participación como

DELEGADO ☐ PONENTE ☒ CONFERENCISTA ☐ COMITÉ ORGANIZADOR ☐

PRESIDENTE DE SALA ☐ ASISTENTE ☐

En el Seminario Internacional de Sanidad Vegetal
"Por la Sostenibilidad de los Sistemas Agrícolas y el Bienestar de los Agricultores",
celebrado del 7 al 11 de abril de 2014.

Dado en el Palacio de Convenciones, La Habana, Cuba.

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal — Dirección — INISAV

Dra. Marlene M. Veitía Rubio
PRESIDENTA

INISAV Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal

MINAG MINISTERIO DE LA AGRICULTURA

syngenta

GBM GRUPO B. M. INC.

PALACIO DE CONVENCIONES DE LA HABANA

VII SEMINARIO INTERNACIONAL DE SANIDAD VEGETAL

El Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal

otorga el presente

Certificado

A: Lester Hernández-Rodríguez; P.R. Ramos-González; V. Zamora-Rodríguez; L. Peña-Bárzaga; J.M. Pérez Castro; K. Fernández Marchena y; E. Jaime Higginson.

Por su participación como

DELEGADO ☐ **PONENTE** ☒ **CONFERENCISTA** ☐ **COMITÉ ORGANIZADOR** ☐

PRESIDENTE DE SALA ☐ **ASISTENTE** ☐

En el Seminario Internacional de Sanidad Vegetal

"Por la Sostenibilidad de los Sistemas Agrícolas y el Bienestar de los Agricultores",

celebrado del 7 al 11 de abril de 2014.

Dado en el Palacio de Convenciones, La Habana, Cuba.

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal
Dirección
INISAV

Dra. Marlene M. Veitía Rubio
PRESIDENTA

INISAV Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal

MINAG MINISTERIO DE LA AGRICULTURA

syngenta

GBM GRUPO B. M. INC.

PALACIO DE CONVENCIONES DE LA HABANA

9th CONGRESS OF CHEMICAL SCIENCES, TECHNOLOGY AND INNOVATION

Quimicuba 2015

The Organizing Committee acknowledges

Hernández-Rodríguez L., Rubio Y., Villalobos W., Moreira L., Zamora V., Ferriol X., Peña I., Luis M.

Who contributed with the following work

EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA PROTEÍNA DE CÁPSIDE DE PINEAPPLE MEALYBUG WILT ASSOCIATED VIRUS-1, -2 Y -3 EN ESCHERICHIA COLI

As Poster Presentation

Prof. Dr. Luis A. Montero Cabrera
President of the Cuban Society of Chemistry

Prof. Dr. Armando Paneque
Session Chair

CITMA MINISTERIO DE CIENCIA TECNOLOGIA Y MEDIOAMBIENTE

Academia de Ciencias REPÚBLICA DE CUBA

ministerio de educación superior

VNIVERSIDAD DE LA HABANA

cujae

JFLAQ Federación Latinoamericana de Asociaciones Químicas

La Habana, Cuba, October 13th to 16th, 2015

CERTIFICADO

VIII Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal 2017

otorgado por:

EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE SANIDAD VEGETAL

A: L.Hernández-Rodríguez, L.Pérez Vicente, L.Nápoles Borrero, O.V. Concepción-Laffitte, M.Cid-Ruiz, Y. Álvarez- Llanes, V Zamora-Rodríguez e I. Peña Bárzaga

Por su participación como:

DELEGADO ☒ PONENTE ☒ CONFERENCISTA ☐ COMITÉ ORGANIZADOR ☐

PRESIDENTE DE SALA ☐ ASISTENTE ☒ PRESENTACIÓN EN CARTELES ☐

En el VIII Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal
"Por la transición de la Agricultura Cubana hacia la Sostenibilidad"
celebrado del 10 al 14 de abril de 2017.

Dado en el Palacio de las Convenciones. La Habana. Cuba.

Dra. Marlene M. Veitía Rubio
PRESIDENTA

INISAV Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal · MINAG Ministerio de la Agricultura · Palacio de Convenciones de La Habana · LAAD · syngenta

Universidad de La Habana
Facultad de Biología
Departamento de Microbiología y Virología

Ciudad de La Habana, 12 de septiembre de 2010

A quien pueda interesar:

Por medio de la presente, hago constar que el Lic. Lester Hernández Rodríguez, Especialista del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, se desempeñó como tutor del Trabajo de Diploma titulado "Caracterización de ampelovirus asociados a la marchitez de la piña en la Isla de la Juventud". Dicha tesis fue realizada y defendida por Maylin Rodríguez Rubial de la carrera de Microbiología en el curso 2009-2010 y asesorada por el Dr. Pedro Luis Ramos González.

Atentamente,

MC. Ana Margarita Manzano León
Responsable Práctica Laboral 5to. Microbiología
Dpto. Microbiología y Virología
Facultad de Biología
Universidad de La Habana

Dra. Annia Hernández Rodríguez
J. Dpto. Microbiología y Virología
Facultad de Biología
Universidad de La Habana

Facultad de Biología
Calle 25 Nº 455, entre J e I, Vedado
La Habana 10400, CUBA

Teléf.: (53) (7) 8 32 1321
Fax: (53) (7) 8 321 321

UNIVERSIDAD DE LA HABANA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

La Dra. Annia Hernández Rodríguez como Responsable de la disciplina Métodos experimentales en Microbiología y Virología que se imparte a la carrera de Microbiología,

CERTIFICA que:

El MSc. Léster Hernández Rodríguez, Investigador Auxiliar del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical se desmpeñó como tutor de los trabajos de Diploma titulados Expresión recombinante de la proteína de cápside de *Pineapple mealybug wilt associated virus-1, -2 y -3* en *Escherichia coli* y Aislamiento y selección de cepas de Pseudomonas con actividad antagonista in vitro ante *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora palmivora* defendidos por las estudiantes Yasmary Rubio Fontanils y Daina Noriega.Toledo.

Esta labor la realizó con gran entrega y dedicación, lo que contribuyó al cumplimiento de los objetivos de la disciplina así como a la formación profesional de ambas estudiantes.

La Habana, 12 de noviembre de 2014.

Dra. Annia Hernández Rodríguez

Visto Bueno: Irina Salgado Bernal

Jefe de Departamento Microbiología y Virología

UNIVERSIDAD DE LA HABANA
DPTO. MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

Facultad de Biología
Calle 25 N° 455, entre J e I, Vedado
La Habana 10400, CUBA

Teléf.: (53) (7) 8 32 1321
Fax: (53) (7) 8 321 321

MINAG
MINISTERIO DE LA AGRICULTURA

El Ministerio de la Agricultura

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

en conmemoración al día de la Ciencia Cubana

Al resultado:

Diversidad de virus asociados a la enfermedad marchitez de la piña en Cuba

en el año 2011.

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical

Dado en La Habana, a los 24 días del mes de marzo de 2012
«Año 54 de la Revolución»

Gustavo Rodríguez Rollero
Ministro

MINAG
MINISTERIO DE LA AGRICULTURA

El Consejo Técnico Asesor del
Ministerio de la Agricultura
En uso de las atribuciones que le confiere
la Resolución No. 556/2010 y con el propósito
de reconocer los resultados de la Ciencia
y la Innovación Tecnológica adoptó el siguiente

ACUERDO

PRIMERO: Conceder uno de sus Premios Ramales del año 2011, al resultado denominado:

Diversidad de virus asociados a la enfermedad marchitez de la piña en Cuba

Unidad Ejecutora Principal del Resultado: **Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical**

SEGUNDO: a todos los efectos de autoría del resultado premiado y acorde a la propuesta recibida reconocer a las personas que se relacionan:

Autores principales: Lester Hernández Rodríguez y Pedro Luis Ramos González

Otros autores: Maylin Rodríguez Rubial, Gabriel García García. Victoria Zamora Rodríguez, Inés Peña Barzaga, Juana María Pérez, Xenia Ferriol Marchena

Colaboradores: Kristoffer Mejias, Ana María Aldana, Alexander Banguela, Maritza Luis Pantoja, Doris Hernández, Jorge Luis Tapia, Caridad González, Mayda

TERCERO: Otorgar en acto público el correspondiente diploma que certifica lo anterior a las autoridades de las entidades donde fue obtenido el resultado premiado y a través de sus autores a quienes entregamos este acuerdo

Y para que así conste se emite el presente acuerdo el 24 de marzo del 2012 y en conmemoración del Día de la Ciencia Cubana "Año 54 de la Revolución"

Dra. C Maricela Díaz Rodríguez
Secretaria

MINAG

MINISTERIO DE LA AGRICULTURA

Se otorga el presente

RECONOCIMIENTO

En conmemoración al Día de la Ciencia Cubana y al 90 Cumpleaños del Comandante en Jefe

Al resultado: Desarrollo de prospecciones, herramientas de diagnóstico y estudios de caracterización de plagas cuarentenarias y reglamentadas en los frutales de mayor importancia económica en Cuba.

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical

Dado en La Habana, a los 5 días del mes de abril de 2016
"Año 58 de la Revolución"

Gustavo Rodríguez Rollero
Ministro

MINAG
MINISTERIO DE LA AGRICULTURA

El Consejo Técnico Asesor del
Ministerio de la Agricultura
En uso de las atribuciones que le confiere
la Resolución No. 556/2010 y con el propósito
de reconocer los resultados de la Ciencia
y la Innovación Tecnológica adoptó el siguiente

ACUERDO

PRIMERO: Conceder uno de sus Premios Ramales del año 2015, al resultado denominado:

Desarrollo de prospecciones, herramientas de diagnóstico y estudios de caracterización de plagas cuarentenarias y reglamentadas en los frutales de mayor importancia económica en Cuba.

Unidad ejecutora principal del Resultado: **Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical**

Otras entidades participantes: [2]Empresa Agroindustrial Ceballos (Ciego de Ávila), [3]Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV), [4]UCTB Félix Duque (Jagüey Grande, Matanzas), [5]Empresa Agroindustrial Victoria de Girón (Jagüey Grande, Matanzas)

SEGUNDO: A todos los efectos de autoría del resultado premiado y acorde a la propuesta recibida reconocer a las personas que se relacionan

Autores principales: Lester Hernández-Rodríguez[1], Inés Peña Bárzaga[1], Xenia Ferriol Marchena[1], Edel Pérez López[1], Maritza Luis Pantoja[1], Camilo Paredes Tomás[1], Ronal Pacheco Sanchez[1], María Bárbara Lugo[1], Ana Margarita Manzano[1], Daylé López Hernández[2].

Otros autores: Victoria Zamora Rodríguez[1], Juana María Pérez[1], Yilian Llanes Alvarez[1], Lochy Batista le Riverend[1], Daina Noriega Toledo[1], Dariel García Rodríguez[3], Adys Gómez Montes de Oca[1]

Colaboradores: Sergio Lázaro Mieres[1], Leidy García Pérez[1], Deny David Morales[1], Liset Manzano Alfonso[1], Miguel Aranguren[4], Juan Carlos Casín[3], Juliette Valdez-Infante Herrero[1], Ana María Aldana[1], Kristoffer Mejias[1], Eugenio Alonso Oliva[5]

TERCERO: Otorgar en acto público el correspondiente diploma que certifica lo anterior a las autoridades de las entidades donde fue obtenido el resultado premiado y a través de sus autores a quienes entregamos este acuerdo.

Y para que así conste se emite el presente acuerdo el día 5 de abril del 2016 en conmemoración del Día de la Ciencia Cubana "Año 58 de la Revolución"

Dra. C Maricela Díaz Rodríguez
Secretaria

Ficha de los resultados de la investigación científica

Introducción ID_____ **Resultado de** __X__ **Código:** 6RI 413
Directa **la investigación**

Denominación del resultado: La piña ratón (*Bromelia pinguiin* L.), un nuevo hospedero alternativo para *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-2 (PMWaV-2).

Entidad que obtuvo el resultado: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT).

Entidad que aplicará el resultado: Grupo Empresarial Frutícola.

Efecto económico o nivel de impacto social:
La determinación de la piña ratón (*Bromelia pinguiin* L.), como un nuevo hospedero alternativo para *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-2 (PMWaV-2) tiene un impacto económico importante puesto que implicará cambios en las estrategias de manejo de la enfermedad marchitez de la piña, una de las principales enfermedades que limitan la potencialidad productiva y el desarrollo del cultivo. En las poblaciones rurales es muy común la utilización de esta planta como cerca viva en las fincas. Al constituir esta planta hospedero alternativo para este virus, las cercas constituyen la fuente de inóculo primaria para plantaciones de piña que se formen en la vecindad de estas cercas, propiciando así la diseminación de los agentes virales y de la enfermedad en nuevas plantaciones. Con la capacitación de los productores con el conocimiento generado durante la ejecución de este proyecto, se evitará que siembren plantas de esta especie de bromeliáceas, lo que contribuye a disminuir el riesgo asociado al desarrollo de epifitias de marchitez de la piña en el cultivo. Estos resultados constituyen una importante información científica novedosa a tomar en cuenta en la implementación de medidas de manejo de esta enfermedad a la hora de establecer nuevas plantaciones.

Forma de Aprobación: Comisión de Introducción de logros, Acuerdo No.7 Acta No 2 del 27 de septiembre de 2011

Año de Introducción: 2009

Nivel de Dirección en la obtención del resultado (Jefe de proyecto o de etapa): Proyecto financiado por el Grupo Empresarial Frutícola (**0578**): "Implementación de diagnósticos y métodos de saneamiento para el diseño de sistemas de certificación de material de propagación de los frutales piña, fresa y uva".

Autores principales: Lester Hernández, Pedro Luís Ramos González, Gabriel García García, Inés Peña Bárzaga, Victoria Zamora, Juana María Pérez.

Descripción del resultado y tecnología para su utilización.
Con el objetivo de investigar si la piña ratón constituye un hospedero alternativo para los PMWaVs se colectaron plantas con síntomas similares a los informados para la

enfermedad en las especies de *Ananas comosus* (L.) (cv. Española roja y Cayena lisa). Se localizaron plantas de Banes, Holguín y Ciego de Ávila, con síntomas de enrojecimiento y necrosis en la punta de las hojas. Además, las puntas de las hojas se encontraban torcidas hacia debajo. Para investigar cual de los PMWaVs se encontraba infectando las plantas se realizaron análisis de reacción en cadena de la polimerasa acoplado a reverso-transcripción utilizando los cebadores 225/226, 223/224, y 263/264. Estos cebadores permiten la amplificación de un fragmento de 590 pares de bases del gen que codifica para la proteína de shock térmico (HSP70h) de PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3, respectivamente. La extracción los ácidos ribonucleicos (ARN) se desarrolló por el protocolo del TRIZOL (Invitrogen, Scotland, UK). Para la RT-PCR se utilizaron los juegos de reactivos de las enzimas *AMV-RT* y *Taq Pol* según las condiciones manual del fabricante (Promega, Madison, USA) utilizando una temperatura de hibridación de los cebadores de 55 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y se obtuvieron bandas con la talla aproximada de 600 pb en tres de las muestras analizadas. Las bandas amplificadas se separaron en geles de agarosa y se ligaron al plasmidio pGEM®-T Easy vector (Promega, Madison, USA). Se secuenciaron tres clones independientes con el cebador M13F-pUC. La secuencia obtenida mostró un 98% de identidad nucleotídica con el fragmento correspondiente de PMWaV-2 aislado de Hawai y Taiwán, y con los aislados obtenidos del mismo virus en la Isla de la Juventud, Ciego de Ávila y La Habana. Con este porcentaje de identidad se demuestra la presencia del PMWaV-2 en las plantas de piña ratón, lo que representa el primer informe de esta especie como hospedante alternativo de estos virus.

Raixa E Llauger Riverón
Director General IIFT

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FRUTICULTURA TROPICAL
MINAG
DIRECTOR GENERAL

FICHA DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Introducción ID Directa_____ **Resultado de la investigación** __X__ **Código:** 6RI 412

Denominación del resultado: Primer informe de la presencia de badnavirus (familia *Caulimoviridae*) en plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) de Cuba. Implementación de herramientas moleculares para su diagnóstico.

Entidad que obtuvo el resultado: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT).

Entidad que aplicará el resultado: Grupo Empresarial Frutícola.

Efecto económico o nivel de impacto social:
La información científica generada no tiene in impacto económico inmediato. Sin embargo, el resultado brinda un importante aporte al conocimiento por ser el primer informe de la presencia de badnavirus en el cultivo de la piña en Cuba. Entre los patógenos que ocasionan enfermedades que limitan la potencialidad productiva y el desarrollo del cultivo de la piña se han informado varios agentes de origen viral como son cinco especies de ampelovirus, denominados *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV-1, -2, -3, -4 y -5) (familia *Closteroviridae*, género *Ampelovirus*), y varios badnavirus (familia *Caulimoviridae*, género *Badnavirus*). En el presente trabajo se describe la obtención de las primeras evidencias moleculares de la presencia de secuencias de ADN de badnavirus en plantas de piña de Cuba, y se establece una técnica de detección para el diagnóstico de los mismos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que además tiene la utilidad de amplificar varios badnavirus en un mismo ensayo. La caracterización e identificación de los badnavirus posibilita contar con información acerca de los patógenos que afectan al cultivo de la piña en Cuba, la cual deberá incluirse en los protocolos de futuros programas de certificación del material de propagación de este cultivo en el país. El método de detección establecido también puede ser aplicado en los programas de cuarentena, erradicación de plantas enfermas y estudios epidemiológicos.

Forma de Aprobación: Comisión de Introducción de logros, Acuerdo No.8 Acta No 2 del 27 de septiembre de 2011

Año de Introducción: 2009

Nivel de Dirección en la obtención del resultado: Jefe de proyecto y de etapa en el proyecto financiado por el Grupo Empresarial Frutícola (**0578**): "Implementación de diagnósticos y métodos de saneamiento para el diseño de sistemas de certificación de material de propagación de los frutales piña, fresa y uva".

Autores principales: Lester Hernández-Rodríguez, Pedro Luis Ramos-González, Gabriel García García, Inés Peña Bárzaga, Victoria Zamora, Juana María Pérez.

Descripción del resultado y tecnología para su utilización: Con el objetivo de establecer una técnica para la detección de badnavirus se utilizó el par de cebadores degenerados Badna-1A y Badna-4, específicos para la amplificación de un fragmento de ADN de este género viral. Estos cebadores permiten la amplificación de un fragmento de entre 544 y 588 pb dentro de la región reverso transcriptasa/RNasa H del marco de lectura 3 (ORF3) de cualquier badnavirus (Geering *et al.*, 2005). El diagnóstico se realizó mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para determinar la presencia de badnavirus en Cuba se colectaron muestras foliares de plantas de piña de la provincia Ciego de Ávila, Granma, Matanzas y La Habana. Las plantas mostraban síntomas de necrosis de la punta de la hoja y enrojecimientos, los que coinciden con los informados en la literatura como característicos de la enfermedad marchitez de la piña. La extracción los ácidos nucleicos (ADN) se desarrolló por el protocolo extracción de ADN del reactivo CTAB (Murray y Thompson, 1980). Para la PCR se utilizaron los juegos de reactivos de las enzimas *Taq Pol* según las condiciones manual del fabricante (Promega, Madison, USA) con temperatura de hibridación de 55°C. Las bandas amplificadas se separaron en geles de agarosa y se ligaron al plasmidio pGEM®-T Easy vector (Promega, Madison, USA). Se secuenciaron cinco clones independientes con el cebador M13F-pUC. La secuencia obtenida mostró porcentajes de identidad nucleotídica mayores del 80% con fragmentos correspondientes a los aislados de badnavirus de Australia y Hawai. Teniendo en cuenta que el criterio de demarcación de especies dentro del género badnavirus es de un 80% de identidad nucleotídica, los resultados demuestran la presencia de secuencias de estos virus. Los badnavirus son pararetrovirus cuyos genomas se integran, al menos parcialmente, en el ADN vegetal. La secuenciación de los amplicones obtenidos permitió verificar la existencia de copias parciales o totales del ADN de los badnavirus en las plantas analizadas lo que representa las primeras evidencias moleculares de la detección de estos virus en cultivos de piña de Cuba e incluso, en la cuenca del Caribe.

Raixa E Llauger Riverón
Directora General IIFT

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FRUTICULTURA TROPICAL
MINAG
DIRECTOR GENERAL

FICHA DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Introducción ID Directa_____ **Resultado de la investigación** _X_____ **Código:** 6RI 411

Denominación del resultado: Aislamiento, clonaje y caracterización del gen que codifica para la proteína de la cápside (CP) de los virus *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1, 2 y 3 (PMWaV-1, -2 y -3).

Entidad que obtuvo el resultado: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT).

Entidad que aplicará el resultado: Grupo Empresarial Frutícola.

Efecto económico o nivel de impacto social:
Los tres productos generados durante la ejecución de esta investigación, los cuales son los genes que codifican para las proteínas de las cápside de los virus PMWaV-1, -2 y -3, tienen un impacto económico inmediato en el avance del trabajo pues serán utilizados para la obtención de las proteínas en sistemas de expresión. Estas proteínas serán la base de la implementación de sistemas de inmuno-diagnósticos que reconozcan específicamente la presencia de estos virus en extractos de plantas de piña, ya sea en plataformas de ELISA o inmunoimpresiones de tejido. En cualquiera de estos casos, se posibilita la detección en grandes volúmenes de muestras debido a la disminución del costo por ensayo y el mejoramiento de la procesatividad. Debido a su bajo costo y alta sensibilidad, estos métodos de detección serán aplicados en los programas certificación de material de propagación, importante e impr4escindible medida de manejo de las enfermedades virales, y sistema que se necesita implementar con la mayor premura posible. También pueden ser utilizados en la cuarentena vegetal, posentrada de variedades introducidas en los programas de mejoramiento y en la erradicación de plantas enfermas y estudios epidemiológicos. Además la caracterización de estos genes aumenta el nivel de conocimiento acerca de los ampelovirus, agentes asociados a la enfermedad marchitez de la piña, una de las principales enfermedades que limitan la potencialidad productiva y el desarrollo de este frutal en el país.

Forma de Aprobación: Comisión de Introducción de logros, Acuerdo No.6 Acta No 2 del 27 de septiembre de 2011

Año de Introducción: 2011

Nivel de dirección en la obtención del resultado: Jefe de proyecto y de etapa del proyecto GEF 0578: "Implementación de diagnósticos y métodos de saneamiento para el diseño de sistemas de certificación de material de propagación de los frutales piña, fresa y uva".

Autores principales: Lester Hernández-Rodríguez, Pedro Luís Ramos-González, Gabriel García García, Inés Peña Bárzaga, Victoria Zamora, Juana María Pérez.

Descripción del resultado y tecnología para su utilización:
Con el objetivo de amplificar los genes que codifican para las proteínas de la cápside de PMWaV-1, -2 y -3 se diseñaron los tres pares de cebadores, 1085/1086, 1087/1088 y 1089/1090, permiten la amplificación específica de bandas de 784, 909 y 801 pb del gen completo de la CP de PMWaV-1, -2 y -3, respectivamente. La amplificación se realizó mediante un ensayo de reverso transcripción acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Las extracciones de los ácidos ribonucleicos (ARN) utilizados como molde en las reacciones de RT-PCR se desarrollaron por el protocolo del TRIZOL (Invitrogen, Scotland, UK). Para la RT-PCR se utilizaron los juegos de reactivos del sistema *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y con temperatura de hibridación de los cebadores 55 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y se visualizaron bandas con tallas aproximadas de 800 pb en las tres muestras analizadas para cada reacción específica para cada virus. Las bandas amplificadas se separaron en geles de agarosa, se ligaron al plasmidio pGEM®-T Easy vector (Promega, Madison, USA) y se secuenciaron tres clones independientes con el cebador M13F-pUC para la CP de cada virus. Las secuencias obtenidas mostraron identidades nucleotídicas con los genes de los aislados de Hawai y Taiwán superiores al 97% de las tres especies de virus. La traducción de las secuencias nucleotídicas a aminoácidos demostró que no se produjo ningún error en el aislamiento del gen y los porcentajes de similitud de la proteína obtenida observados superaron los 98% de conservación en todos los casos al compararlas con las proteínas de la cápside de los aislados de Hawai de PMWaV-1, -2 y -3. Los análisis demostraron que los genes aislados pueden servir como base para la expresión de estas proteínas de forma recombinante para su posterior utilización en trabajos dirigidos a la obtención de anticuerpos.

Raixa E Llauger Riverón
Directora General IIFT

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FRUTICULTURA TROPICAL
MINAG
DIRECTOR GENERAL

Ficha de los resultados de la investigación científica

Introducción ID_____ **Resultado de** __X__ **Código:** 6RI389
Directa **la investigación**

Nombre del resultado: Establecimiento de un método para la detección por RT-PCR para *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus-1* (PMWaV-1) y primer informe del virus en plantaciones de piña de Cuba.

Instituto que obtuvo el resultado: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT).

Entidad que aplicará el resultado: Grupo Empresarial Frutícola.

Efecto económico o nivel de impacto social:
Entre las principales enfermedades que limitan la potencialidad productiva y el desarrollo del cultivo de la piña (*Ananas* comosus (L.) Merr), se encuentra la marchitez de la piña (MWP, siglas de la frase en inglés *mealybug wilt of pineapple*). La enfermedad ha sido asociada a cinco especies virales del género *Ampelovirus*, denominados *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) -1, -2, -3, -4 y -5, se transmite por cochinillas grises y rosadas (*Dysmococcus* sp.) y se disemina a través del material de propagación. En el presente trabajo se establece una técnica de detección para el diagnóstico de *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 1 a través de la reacción RT PCR. Además, se informa la presencia de este virus por vez primera en Cuba en muestras de plantas de piña del cultivar MD2. El análisis molecular del fragmento viral amplificado demostró una elevada identidad del virus con PMWaV-1 aislado de Australia. La caracterización e identificación de PMWaV-1 posibilita contar con información acerca de los patógenos que afectan al cultivo de la piña en Cuba. El método de detección establecido puede ser aplicado en los programas de cuarentena, certificación de material de propagación, erradicación de plantas enfermas y estudios epidemiológicos.

Forma de aprobación: Comisión de Introducción de logros, Acuerdo 75 Acta No 9 del 7/12/2010

Año de introducción: 2010

Autores principales: Lester Hernández, Pedro Luis Ramos González, Inés Peña Bárzaga, Victoria Zamora, Juana María Pérez.

Nivel de Dirección en la obtención del resultado (Jefe de proyecto o de etapa):
Jefe de proyecto

Descripción del resultado y tecnología para su utilización.
Con el objetivo de establecer una técnica para la detección de PMWaV-1 se diseñó el par de cebadores 225/226, específicos para este virus. Estos cebadores permiten la amplificación de un fragmento de 590 pares de bases del gen que codifica para la proteína de shock térmico (HSP70h) de PMWaV-1. El diagnóstico se realizó mediante un ensayo de reverso transcripción acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Para determinar la presencia de PMWaV-1 en Cuba se

colectaron muestras foliares de plantas de piña del cultivar MD2 en la provincia Ciego de Ávila. Las plantas mostraban síntomas de necrosis de la punta de la hoja y moteados amarillos, los que coinciden con los informados en la literatura como característicos de la enfermedad marchitez de la piña en esta variedad. La extracción los ácidos ribonucleicos (ARN) se desarrolló por el protocolo del TRIZOL (Invitrogen, Scotland, UK). Para la RT-PCR se utilizaron los juegos de reactivos de las enzimas *AMV-RT* y *Taq Pol* según las condiciones manual del fabricante (Promega, Madison, USA). La reacción de reverso transcripción se realizó a 42 °C, y se incubo durante una hora. El PCR se realizó con el siguiente algoritmo: 5 min. a 95 °C, 1 min. a 95 °C, 2 min. a 55 °C y 2 min. a 72 °C, 45 ciclos. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y se obtuvo una banda con talla aproximada de 590 pb en tres de las muestras analizadas. Las bandas amplificadas se separaron en geles de agarosa y se ligaron al plasmidio pGEM®-T Easy vector (Promega, Madison, USA). Se secuenciaron tres clones independientes con el cebador M13F-pUC. La secuencia obtenida mostró un 100% de identidad nucleotídica con el fragmento correspondiente de PMWaV-1 aislado de Australia (número de acceso en el GenBank: HQ129930). Con este porcentaje de identidad se demuestra la presencia del PMWaV-1 en Cuba, lo que representa el primer informe del virus. Posteriormente se analizaron un total de 25 muestras procedentes de plantaciones de piña cultivar Española roja de La Habana, Villa Clara, Holguín y Matanzas. Se amplificaron bandas con la talla esperada en 17 de las 25 muestras analizadas. Además, se obtuvieron resultados positivos en muestras de todas las plantaciones incluidas en los ensayos lo que sugiere una amplia distribución del virus en el país.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FRUTICULTURA TROPICAL
M I N A G
DIRECTOR GENERAL

Raixa E Llauger Riverón
Directora General IIFT.

Ficha de los resultados de la investigación científica

Introducción ID___ **Resultado de la investigación** __X__ **Código:** 6RI 374
Directa

Nombre del resultado: Primer reporte de *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus-3* (PMWaV-3) en plantaciones de piña de Cuba.

Instituto que obtuvo el resultado: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT)

Entidad que aplicará el resultado: Grupo Empresarial Frutícola.

Efecto económico o nivel de impacto social:
Entre las principales enfermedades que limitan la potencialidad productiva y el desarrollo del cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr), se encuentra la marchitez o "Wilt" de la piña (PMW, siglas de la frase en inglés Pinneapple Mealybug Wilt). Esta enfermedad ha sido asociada en diferentes grados a cinco especies virales del género Ampelovirus, denominados *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* (PMWaV) 1, 2, 3, 4 y 5. La enfermedad se transmite por coccoideos y se disemina a través del material de propagación. En el presente trabajo se analizaron muestras de plantas de piña, cultivar Española roja, procedentes de la Isla de la Juventud. Los estudios mediante la técnica de RT PCR, implementada en nuestro laboratorio y la secuenciación de parte del gen *hsp 70* del genoma viral demostraron la presencia de PMWaV-3, de forma inequívoca. Este resultado constituye el primer informe de la presencia de este virus en Cuba. Su caracterización e identificación posibilitará contar con técnicas para su diagnóstico que puedan ser aplicadas a los programas de cuarentena, certificación de material de propagación, erradicación de plantas enfermas y estudios epidemiológicos.

Año de introducción. 2009

Fecha de aprobación: Consejo Científico
(Comisión de Introducción de Logros) Acta No4del 11/11/09 Acuerdo: 13

Nivel de Dirección en la obtención del resultado (Jefe de proyecto o de etapa): Participante

Autores principales: Lester Hernández, Pedro Luís Ramos González, Inés Peña Bárzaga, Maylin Rodríguez Rubial, Juana María Pérez.

Descripción del resultado y tecnología para su utilización.
Con el objetivo de determinar la presencia del PMWaV-3 en Cuba se colectaron muestras del cultivar Española roja en la Isla de la Juventud. Las plantas mostraban los síntomas característicos de la enfermedad marchitez de la piña. El análisis de las mismas se realizó mediante la técnica de RT PCR implementada en nuestro laboratorio y se emplearon cebadores específicos para este virus. Los cebadores amplifican un fragmento de 490 pares de bases del gen que codifica para la proteína de shock térmico (HSP70h) del PMWaV-3. La extracción los ácidos ribonucleicos (ARN) se desarrolló por el protocolo del TriReagent, y para la reverso-transcripción se utilizó la enzima AMV-RT, los cebadores específicos, los dNTPs, DTT y se incubo a 45°C una hora. El PCR se realizó con un programa de 5 min. de desnaturalización a 95 °C, 1 min. a 95 °C , 2 min. a 55 °C y 2 min. a 72 °C durante 45 ciclos. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y se obtuvo una banda con la talla esperada de aproximadamente 490 pb. El amplicón obtenido se clonó en el pGEM-Tvector easy y se secuenciaron cuatro clones independientes con el cebador M13F-pUC. La secuencia obtenida mostró un 98% de identidad nucleotídica con el fragmento correspondiente de PMWaV-3 aislado de Hawai. Con este porcentaje de identidad se demuestra la presencia del PMWaV-3 en Cuba, lo que representa el primer informe del virus en nuestro país.

Raixa E Llauger Riverón
Director General IIFT

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FRUTICULTURA TROPICAL
DIRECTOR GENERAL

Ficha de los resultados de la investigación científica

Introducción ID___ **Resultado de** __X____ **Código:** 6RI 575
Directa **la investigación**

Nombre del resultado: Metodología para la detección mediante RT-PCR de *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus-3*

Instituto que obtuvo el resultado: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT)

Entidad que aplicará el resultado: Grupo Empresarial Frutícola

Efecto económico o nivel de impacto social:
El *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus-3* (PMWaV-3) constituye uno de los virus del género *Ampelovirus* que infectan plantas de piña en varios de los países productores de este frutal en el mundo. Hasta el momento se han informado la existencia de cinco virus diferentes dentro de este género, con acrónimos PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4 y PMWaV-5. Estos virus, en diferentes grados, se han asociado a la enfermedad marchitez o "Wilt" de la piña, que constituye una limitación de la potencialidad productiva y de desarrollo de este cultivo. Hasta la fecha, en Cuba solo se ha informado la presencia del PMWaV-2 en plantaciones de Ciego de Ávila. El desarrollo de técnicas para el diagnóstico sencillo y rápido de estos virus es sumamente útil tanto para los programas de introducción de nuevas variedades, como para la cuarentena y saneamiento dentro de un programa de certificación de material de propagación libre de virus. En este trabajo se estableció un método para el diagnóstico de PMWaV-3 mediante RT-PCR.

Año de introducción: 2009

Fecha de aprobación: Consejo Científico
(Comisión de Introducción de Logros) Acta No 4 del 11/11/09 Acuerdo: 13

Nivel de Dirección en la obtención del resultado (Jefe de proyecto o de etapa): Participante

Autores principales: Lester Hernández, Pedro Luís Ramos González, Inés Peña Bárzaga, Maylin Rodriguez Rubial, Juana María Pérez.

Descripción del resultado y tecnología para su utilización.
Con el objetivo de contar con una técnica para el diagnóstico de PMWaV-3 se sintetizaron los cebadores 263/264 específicos para este virus. Estos cebadores amplifican un fragmento de 490 pares de bases del gen de la proteína shock térmico homóloga *HSP70h* de PMWaV-3. Se colectaron plantas con los síntomas clásicos descritos para la PMW en plantaciones de la Isla de la Juventud. La extracción de los ácidos ribonucleicos (ARN) se desarrollo por el protocolo del TriReagent. Para la reverso-transcripción se usó la enzima *AMV RT*, hibridando los cebadores al calentar a 80°C y posterior incubación en hielo. Seguidamente se le añadió la mezcla con la enzima *AMV RT*, los dNTPs, DTT y se incubó a 45°C una hora. El PCR se realizó a una temperatura de hibridación de 55°C usando la *taq Pol* (Invitrogen). Todas las plantas que mostraron síntomas de marchitez y que se analizaron con la técnica que aquí se propone resultaron ser positivas (mostraron la banda aproximada sobre los 500 pb al compararla con el marcador de peso molecular 1kb (PROMEGA)). De igual forma se obtuvo una banda en el control positivo y no se obtuvo ninguna en los análisis de los extractos de ARN a partir de plantas asintomáticas. De este modo, se implemento un método para el diagnóstico del PMWaV-3 el cual esta disponible para su incorporación a los programas de cuarentena, saneamiento y certificación de material de propagación.

Raixa E Llauger Riverón
Directora General IIFT

Ficha de los resultados de la investigación científica

Introducción ID___ **Resultado de** __X____ **Código:** 6RI 0210
Directa **la investigación**

Nombre del resultado: Implementación de un método para el diagnóstico del *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus-2* (PMWaV-2) en extractos de ARN de piña

Instituto que obtuvo el resultado: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT).

Entidad que aplicará el resultado. Grupo Empresarial Frutícola

Efecto económico o nivel de impacto social:
La Marchitez de la piña es una enfermedad que ocasiona pérdidas de hasta un 40% de las cosechas de ese cultivo en Cuba. *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus-2* (PMWaV-2) es uno de los ampelovirus que se relaciona directamente con la aparición de la enfermedad. La diseminación de la virosis es a través de sus vectores, las cochinillas, y de la propagación vegetativa. Esta última, la forma tradicional de reprodución del cultivo, representa la vía fundamental de dispersión del virus hacia nuevas plantaciones. A nivel mundial se han descrito cinco virus diferentes asociados a la enfermedad: PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4, y PMWaV-5. Hasta el momento, en Cuba solo se ha informado la presencia de PMWaV-2 en plantaciones de Ciego de Ávila. En este sentido, contar con técnicas para el diagnóstico de este virus, que puedan ser incorporadas a los programas de certificación del material de propagación, es de vital importancia para el desarrollo del cultivo. El procedimiento que se describe en este resultado ofrece alta sensibilidad y especificidad para la detección de PMWaV-2.

Año de introducción: 2009
Fecha de aprobación: Consejo Científico
(Comisión de Introducción de Logros) Acta No 4 del 11 /11/09 Acuerdo 13

Nivel de Dirección en la obtención del resultado (Jefe de proyecto o de etapa): Participante
Autores principales: Lester Hernández, Pedro Luis Ramos González, Inés Peña Bárzaga, Maylin Rodríguez Rubial, Juana María Pérez.

Descripción del resultado y tecnología para su utilización.
Se sintetizaron los cebadores específicos 223/224 para PMWaV-2. Estos cebadores específicos amplifican un fragmento de 610 pares de bases del gen de la proteína de shock térmico HSP70h de PMWaV-2. Las muestras de plantas con los síntomas descritos para la Marchitez de la Piña se colectaron en plantaciones de la Isla de la Juventud. La extracción de los ácidos ribonucleicos (ARN) se desarrolló por el protocolo *TriReagent*, para muestras con alto contenido de carbohidratros. Para la reverso-transcripción se usó la enzima *AMV RT*, La desnaturalización y la hibridación de los cebadores se realizó a partir de 80°C y posterior incubación en hielo. Se le añadió la mezcla con la enzima, los dNTPs, DTT y se incubó a 45°C por una hora. El PCR se realizó con un programa de 5 min. de desnaturalización a 95 °C, 1 min. a 95 °C, 2 min. a 55 °C y 2 min. a 72 °C durante 45 ciclos. En las muestras analizadas se obtuvo la banda de talla aproximada 610 pb al compararla con el marcador de peso 1kb (PROMEGA). De forma similar, en el control positivo se visualizó una banda de 610 pb, mientras que en el control negativo no se obtuvo amplicón alguno. Todas las plantas que mostraron síntomas de la Marchitez de la Piña se procesaron con esta técnica y resultaron positivas a la infección por el PMWaV-2.

Raixa E Llauger Riverón
Director General IIFT