

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 Rodríguez¹

OTROS AUTORES: Pedro Luis Ramos González², Victoria Zamora Rodríguez¹, Lisela Carmona³, William Villalobos³, Ana Arruabarrena⁴, Inés Peña Bárzaga¹, Maylín Rodríguez Rubial¹, Yasmery Rubio Fontanills⁵.

COLABORADORES: Yilian Llanes Alvarez¹, Luiz Pérez Vicente⁶, Lelurllys Nápoles Borrero⁷, Oscar Vitalio Concepción Laffitte⁷, Lochy Batista Le Riverend¹, Miguel Ramos Leal¹, Elisa Javier Higginson⁶, Gabriel García García¹, Juana María Pérez Castro¹, Alba M. Peralta Martín¹, Sergio Lázaro Mieres¹, Fernando Rivas⁴, Ana Bertalmio⁴, María José Benitez-Galeano⁸, Mario Giambiasi⁴, Rodney Colina⁸.

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

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, lesterhernandeziiift@gmail.com.

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 utilizarán 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.

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 Sciences), 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 *Citrifruta* (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 Bioplasmas 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.org/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, Lelurllys 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 BIOTECNOLOGÍA 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*

Juventud. Tesis en opción del grado de *a la marchitez de la piña en la Isla de la* 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 proteína 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: Yasmery 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 Luis 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 Luis 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 Luis 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). **Lester Hernández-Rodríguez**, Pedro Luis Ramos-González, Gabriel García García, Inés Peña Bárzaga, Victoria Zamora, Juana María Pérez.

La piña ratón (*Bromelia pinguin* 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**, Yasmery 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 nucleicos 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 Bázaga.