

Detection of *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 and 3* in Mexico

Detección de *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 y 3* en México

Daniel Leobardo Ochoa-Martínez*, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, CP 56230; **Daniel Emigdio Uriza-Ávila**, INIFAP-Campo Experimental Cotaxtla, km 34.5 Carr. Federal Veracruz-Córdoba, Medellín de Bravo, Ver., CP 94270; **Reyna Isabel Rojas-Martínez** y **Douglas Rodríguez-Martínez**. Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, CP 56230. *Autor de Correspondencia: ldaniel@colpos.mx.

Recibido: 06 de Enero, 2016

Aceptado: 28 de Marzo, 2016

Ochoa-Martínez DL, Uriza-Ávila DE, Rojas-Martínez RI, Rodríguez-Martínez D. 2016. Detection of *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 and 3* in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 131-141.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1601-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1601-1)

Primera publicación DOI: 29 de Marzo, 2016.

First DOI published: March 29th, 2016.

Abstract. In El Bajo Papaloapan, the main producing area of pineapple of Mexico, leaves with typical symptoms of viral infection consisting in chlorosis, flaccidity, reduced growth and reddening were collected. By RT-PCR with specific primers for the hsp70 gene and subsequent sequencing were detected *Pineapple mealybug wilt virus associated-virus 1* (PMWaV-1) and *Pineapple mealybug wilt virus associated-3* (PMWaV-3). From the sequences obtained a tree was done with sequences from different regions of the world available in GenBank in order to know their similarity. The sequence obtained from the Mexican isolate PMWaV-1 was genetically related

Resumen. En El Bajo Papaloapan, principal zona productora de piña, se colectaron hojas con síntomas de clorosis, flacidez, reducción del crecimiento y enrojecimiento foliar típicos de infecciones virales en este cultivo. Mediante RT-PCR con indicadores específicos para el gen hsp70 y posterior secuenciación, fueron detectados los virus *Pineapple mealybug wilt associated-virus 1* (PMWaV-1) y *Pineapple mealybug wilt associated-virus 3* (PMWaV-3). A partir de las secuencias obtenidas se construyó un árbol con secuencias procedentes de diferentes regiones del mundo disponibles en el GenBank para determinar su similitud. La secuencia obtenida del aislamiento mexicano del PMWaV-1 resultó ser más próxima genéticamente a secuencias de aislamientos procedentes de Cuba, Taiwán, Tailandia y Hawai y más distante del aislamiento australiano. La secuencia obtenida para el aislamiento mexicano del PMWaV-3 se encontró más relacionada con los aislamientos de Hawai, Cuba, Australia y Taiwán y más distante del aislamiento tailandés. Este es el primer reporte de la presencia de estos dos virus en México.

to the sequences of isolates from Cuba, Taiwan, Thailand and Hawaii and more distant from the Australian isolate. The sequence obtained for the Mexican isolate PMWaV-3 was more related to isolates from Hawaii, Cuba, Australia and Taiwan and more distant from the Thailand isolate. This is the first report of the presence of these two viruses in Mexico.

Additional keywords: ampeloviruses, mealybug, pineapple red wilt, phylogeny.

El Bajo Papaloapan is the main producing area of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) of Mexico which includes the regions of Loma Bonita (Oaxaca), Linda Vista, Villa Azueta, El Zopilote, Isla, Juan Rodríguez Clara and Los Tigres (Veracruz) where this crop is an important economic activity. At global level a viral complex associated with pineapple is known (Sether *et al.*, 2010), consisting of *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* (PMWaV-1), *Pineapple mealybug wilt associated virus-2* (PMWaV-2) and *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) transmitted by mealybugs *Dysmicoccus neobrevipes* and *Dysmicoccus brevipes* (Sether *et al.*, 1998). Mealybug wilt of pineapple (MWP) is one of the most destructive diseases of this species in many parts of the world and it is associated with the infection of PMWaV-2 combined with mealybug feeding (Sether *et al.*, 2005). In Hawaii, it was found that mealybug feeding alone or in combination with PMWaV-1 or PMWaV-3 does not cause MWP requiring the presence of PMWaV-2 for this to occur (Sether and Hu, 2002). Symptoms of the disease consist of a severe dieback, reddish coloration of leaves and wilting which together cause the collapse of mature plants (Carter, 1945). It has also been reported a

Palabras clave adicionales: ampelovirus, piojo harinoso, marchitez roja de la piña, filogenia.

El Bajo Papaloapan es principal zona productora de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) de México que incluye las regiones de Loma Bonita (Oaxaca), Linda Vista, Villa Azueta, El Zopilote, Isla, Juan Rodríguez Clara y Los Tigres (Veracruz), donde este cultivo representa una importante actividad económica. A nivel global se conoce un complejo viral relacionado con la piña (Sether *et al.*, 2010), que consiste en *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* (PMWaV-1), *Pineapple mealybug wilt associated virus-2* (PMWaV-2) y *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) transmitido por los piojos harinosos *Dysmicoccus neobrevipes* y *Dysmicoccus brevipes* (Sether *et al.*, 1998). El marchitamiento asociado al piojo harinoso en piña (MaPHP) es una de las enfermedades más destructivas de esta especie en muchas partes del mundo y se relaciona con la infección de PMWaV-2 en combinación con la alimentación del piojo harinoso (Sether *et al.*, 2005). En Hawaii, se encontró que sólo la alimentación del piojo harinoso o en combinación con PMWaV-1 o PMWaV-3 no causa MaPHP, y se requiere la presencia de PMWaV-2 para que se lleve a cabo (Sether y Hu, 2002). Los síntomas de la enfermedad consisten en un desecamiento severo, hojas de color rojizo y marchitamiento, que juntos causan el colapso de plantas adultas (Carter, 1945). También se ha reportado una coloración café de las plantas afectadas, flacidez, enroscado de las puntas de las hojas hacia abajo, reducción del sistema radical y frutas con pulpa fibrosa y de sabor agrio (Borroto *et al.*, 1998). La detección de estos virus fue llevada a cabo con inmunoimpresión de tejido y con RT-PCR con indicadores específicos al gen hsp70 (Sether *et al.*, 2001; Sether *et al.*, 2005).

brown coloration of the affected plants, flaccidity, downward curling of the leaf tips, reduction of the root system and fruits with fibrous pulp and tasting sour (Borroto *et al.*, 1998). Detection of these viruses has been done by tissue blot immunoassay and by RT-PCR with primers specific to the hsp70 gene (Sether *et al.*, 2001; Sether *et al.*, 2005). In the producing area of pineapple of El Bajo Papaloapan producers and technicians have been observed plants with symptoms of flaccidity, chlorosis, light reddening or wilt without root rot or necrosis of vascular bundles randomly distributed within the plots. Since no damage of the root system or the vascular bundles has been observed in the affected plants it is possible that these symptoms are associated with PMWaV-1, or PMWaV-2 or PMWaV-3, causal agents of the MWP one of the most important diseases of this crop in the world. So, the objective of this study was to determine the presence of these viruses in the region and to know their relationships with several isolates of the world.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

In plots with different production system located in the region of Loma Bonita (Oaxaca), Linda Vista, Sabaneta, Ejido, Isla and Los Tigres (Veracruz), a directed sampling was conducted in July 2011 to collect leaf tissue of pineapple plants var. Cayena or the MD2 hybrid with symptoms of flaccidity, wilting, reddish or tan coloration of leaves, general reduction of growth associated with pineapple mealybug wilt as well as asymptomatic plants. All sampled plants were revised in search of mealybugs and in those showing wilting, roots were dug up to observe them and discard that this flaccidity was associated with root rot or necrosis

En el área productora de piña de El Bajo Papaloapan, productores y técnicos han observado plantas con síntomas de flacidez, clorosis, ligero enrojecimiento o marchitamiento sin pudrición de la raíz o la necrosis de haces vasculares distribuidas al azar entre las parcelas. Debido a que no se ha observado daños del sistema radical o de los haces vasculares en las plantas afectadas, es posible que estos síntomas estén relacionados con PMWaV-1 o PMWaV-2 o PMWaV-3, agentes causales del MaPHP, una de las más importantes enfermedades de este cultivo en el mundo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de estos virus en la región y conocer su relación con varios aislados del mundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reolección de muestras

En parcelas con diferentes sistemas de producción ubicadas en la región de Loma Bonita (Oaxaca), Linda Vista, Sabaneta, Ejido, Isla y Los Tigres (Veracruz), un muestreo dirigido fue llevado a cabo en Julio de 2011 para reunir tejido de hojas de plantas de piña var. Cayena o el híbrido MD2 con síntomas de flacidez, marchitamiento, coloración rojiza o café en las hojas, reducción general en el crecimiento, relacionados con el marchitamiento asociado al piojo harinoso de piña, así como plantas asintomáticas. Todas las plantas muestreadas fueron revisadas en busca de piojo harinoso, y en aquellas que presentaban marchitamiento, las raíces fueron desenterradas para observarlas y descartar que esta flacidez estuviera relacionada con la pudrición de la raíz o la necrosis de haces vasculares. El tejido vegetal fue colocado en bolsas de polietileno y etiquetadas para ser transportadas al laboratorio.

Extracción de RNA y RT-PCR

of vascular bundles. The plant tissue was placed in polyethylene bags and labeled for its transportation to the laboratory.

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA extraction from collected leaves was performed with Trizol[®] method (AFGC, 2002), according to the manufacturer's instructions. The RNA obtained was employed to generate cDNA and use it to realize PCR (MMLV enzyme and Taq polymerase from Promega[®] were used) with specific primers of a segment of the hsp70 gen from PMWaV-1 (5'-ACAGGAAGGACAACACTCAC-3'/5'-CGCACAAACTTCAAGCAATC-3'), PMWaV-2 (5'-CATACGAACTAGACTCATACG-3'/5'-TCATTCCACTCACTTATCGTTG-3') and PMWaV-3 (5'-AGTTCACTGTAGATTTTCGGA-3'/5'-ATTCATGGATGTGTATCG-3'), that amplify 589, 609 and 495 bp, respectively (Sether *et al.*, 2005; Sether *et al.*, 2009). PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2 % agarose gel containing ethidium bromide. As reference a molecular weight marker of 100 bp was used, the gels were visualized on a UV transilluminator Syngene[®] mod. Gene Snap. They were then purified using the Wizard SV gel and PCR clean-up system[®] and sequenced at the Institute of Biotechnology, UNAM.

Sequence analysis

Sequences were used to obtain Contigs with DNA Baser Sequence Assembler v2 (www.dnabaser.com). Contigs were after analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of NCBI (National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

The resulting sequences were compared with the 15 existing sequences found in GenBank (NCBI),

La extracción total del RNA de las hojas colectadas fue llevada a cabo con el método Trizol[®] (AFGC, 2002), según las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue usado para generar cDNA que se usó para realizar PCR (se usaron la enzima MMLV y la Taq polimerasa de Promega[®]) con indicadores específicos de un segmento del gen hsp70 de PMWaV-1 (5'-ACAGGAAGGACAACACTCAC-3'/5'-CGCACAAACTTCAAGCAATC-3'), PMWaV-2 (5'-CATACGAACTAGACTCATACG-3'/5'-TCATTCCACTCACTTATCGTTG-3') y PMWaV-3 (5'-AGTTCACTGTAGATTTTCGGA-3'/5'-ATTCATGGATGTGTATCG-3'), que amplifican 589, 609 y 495 bp, respectivamente (Sether *et al.*, 2005; Sether *et al.*, 2009). Se analizaron los productos PCR por electroforesis en un gel al 2 % de agarosa que contenía bromuro de etidio. Como referencia se usó un marcador de peso molecular de 100 bp, los geles fueron visualizados en un transiluminador UV Syngene[®] mod. Gene Snap. Luego fueron purificados usando el gel Wizard SV and PCR clean-up system[®] y secuenciados en el Instituto de biotecnología, UNAM.

Sequence analysis

Se usaron secuencias para obtener Contigs con el Ensamblador de Secuencias DNA Baser v2 (www.dnabaser.com). Los Contigs luego fueron analizados con el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de NCBI (National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Las secuencias resultantes fueron comparadas con las 15 secuencias existentes halladas en el GenBank (NCBI), con los siguientes números de acceso de PMWaV-1: Cuba (HQ129930.1), Taiwán (EU769113.1), Tailandia (I583225.1 & EF620774.1), Hawai (AF414119.3)

with the following accession of PMWaV-1: Cuba (HQ129930.1), Taiwan (EU769113.1), Thailand (I583225.1 & EF620774.1), Hawaii (AF414119.3) and Australia (EF467923.1); PMWaV-2: Cuba (FN825676); PMWaV-3: Cuba (GU563497.1), Hawaii (DQ399259.2), Australia (EF488755.1 & EF467918.1), Taiwan (FJ209047.1) and Thailand (HE583227.1); PMWaV-4: USA (EU372003.1); and PMWaV- 5: Australia (EF488753.1).

In order to obtain a visual representation of sequence variability between all isolates, we determinate identity percentage; Neighbor-joining cluster analysis was used to generate rootless trees of the relationships between the 15 sequences. The data set of each of these trees was bootstrapped 1000 times.

RESULTS

During the sampling no plants with typical symptoms of pineapple mealybug wilt described or shown in photographs in different publications were observed. The most frequently observed alterations were flaccidity, chlorosis, and reddish coloration in the center of leaves (Figure 1). No mealybugs were observed in any of the collected plants as well as no visible damage or necrosis in the roots were recorded in those showing wilting.

PMWaV-1 was found in one sample (called as PMWaV-1Mexico) showing reduction of growth and irregular chlorotic spots (Figure 1J) and PMWaV-3 was present in one sample too (called as PMWaV-3Mexico) with chlorosis and reddening of lower leaves (Figure 1K), both collected at Isla, Veracruz. PMWaV-2 was not detected in any of the samples analyzed in this study. Both genomic fragments of PMWaV-1Mexico (GenBank access KC800714.1) and PMWaV-3Mexico (GenBank access KC800715.1) sequenced in this work are

y Australia (EF467923.1); PMWaV-2: Cuba (FN825676); PMWaV-3: Cuba (GU563497.1), Hawaii (DQ399259.2), Australia (EF488755.1 & EF467918.1), Taiwán (FJ209047.1) y Tailandia (HE583227.1); PMWaV-4: EEUU (EU372003.1); y PMWaV- 5: Australia (EF488753.1).

Para obtener una representación visual de la variabilidad de secuencia entre todos los aislados, determinamos porcentaje de identidad; se realizó un análisis de Neighbor-joining para generar árboles sin raíces de las relaciones entre las 15 secuencias. El conjunto de datos de cada uno de estos árboles fue remuestreado 1000 veces.

RESULTADOS

Durante el muestreo no se observaron plantas con los síntomas típicos del marchitamiento asociado al piojo harinoso de la piña descritos o ilustrados en fotografías en diferentes publicaciones. Las alteraciones observadas con mayor frecuencia fueron flacidez, clorosis y una coloración rojiza en el centro de las hojas (Figura 1). No se observaron piojos harinosos en alguna de las plantas recolectadas, así como tampoco se registraron daños visibles o necrosis en las raíces en las que presentaban marchitamiento.

PMWaV-1 fue hallado en una muestra (nombrada PMWaV-1Mexico) presentando reducción de crecimiento y manchas cloróticas irregulares (Figura 1J) y PMWaV-3 también estaba presente en una muestra (nombrada PMWaV-3Mexico) con clorosis y enrojecimiento de hojas inferiores (Figura 1K), ambas tomadas en Isla, Veracruz. PMWaV-2 no fue hallado en alguna de las muestras analizadas en este estudio. Ambos fragmentos genómicos de PMWaV-1Mexico (número de acceso KC800714.1) y PMWaV-3Mexico (número de acceso KC800715.1) secuenciados en este traba-

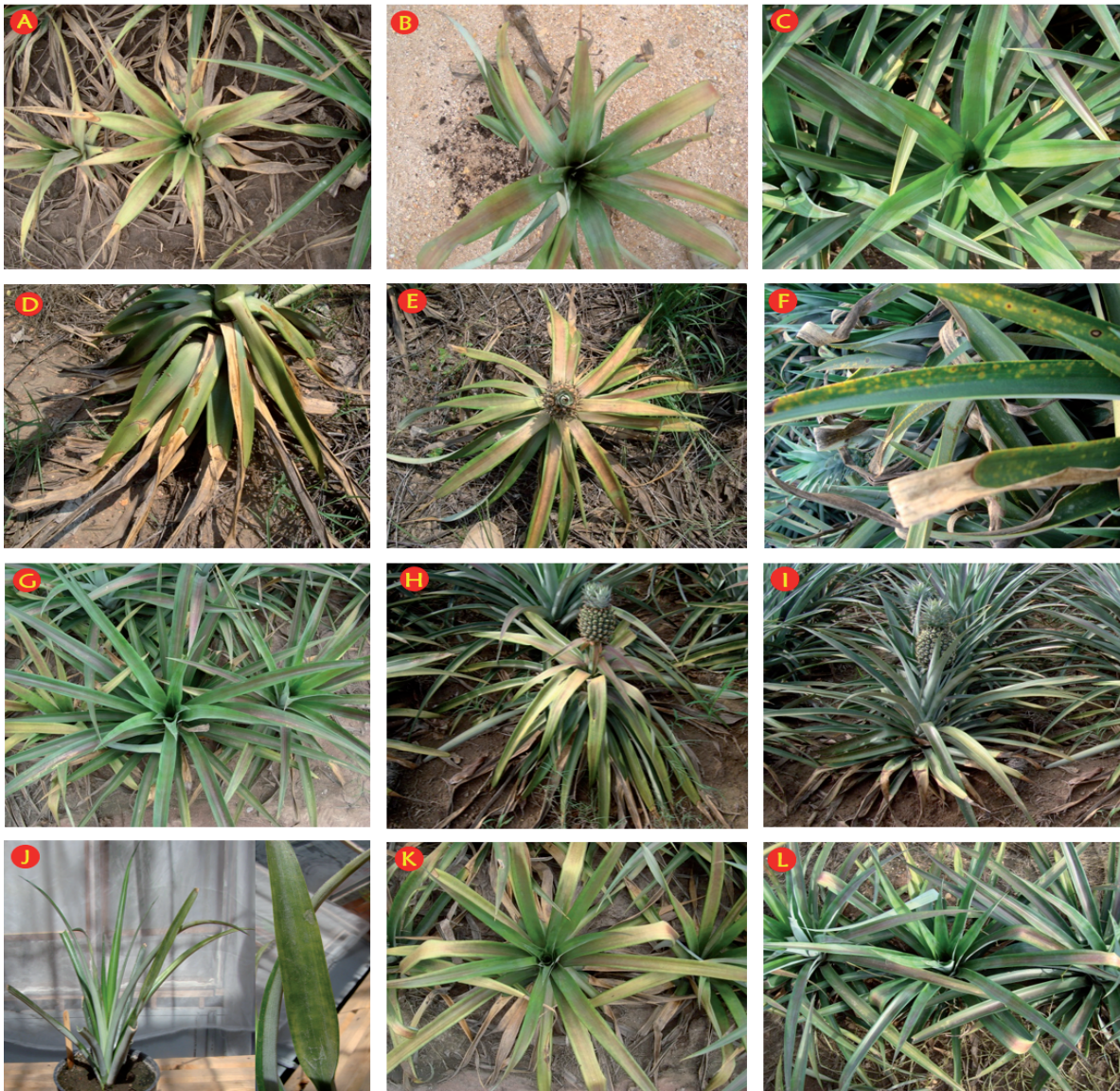


Figure 1. Pineapple plants grown in the region of El Bajo Papaloapan with putative symptoms of mealybug wilt: **A:** apex leaf necrosis, chlorosis and reddish coloration; **B:** reddish coloration in the central part of the leaves and downward curvature of the apex; **C:** Asymptomatic plant; **D:** flaccidity and apical necrosis of leaves; **E:** flaccidity, severe chlorosis and reddening of the central part of the leaves; **F:** yellow chlorotic spots, some with necrotic center; **G:** Asymptomatic plant; **H:** wilting, chlorosis in leaves of the middle part and reddening of upper leaves; **I:** Asymptomatic plant; **J:** reduction of growth and irregular chlorotic spots; **K:** chlorosis and reddening of lower leaves; **L:** reduction of growth, chlorosis of upper leaves, reddening and flaccidity of lower leaves. Plants **D** and **E** were of MD2, the rest of Cayena.

Figura 1. Plantas de piña cultivadas en la región de El Bajo Papaloapan con síntomas putativos de marchitamiento del piojo harinoso: **A:** necrosis del ápice foliar, clorosis y coloración rojiza; **B:** coloración rojiza en la parte central de las hojas y curvatura hacia abajo del ápice; **C:** planta asintomática; **D:** flacidez y necrosis de ápice foliar; **E:** flacidez, clorosis severa y enrojecimiento de la parte central de las hojas; **F:** manchas cloróticas amarillas, algunas con centro necrótico; **G:** planta asintomática; **H:** marchitamiento, clorosis en hojas de la parte central y enrojecimiento de hojas superiores; **I:** planta asintomática; **J:** reducción de crecimiento y manchas cloróticas irregulares; **K:** clorosis y enrojecimiento de hojas inferiores; **L:** reducción del crecimiento, clorosis de hojas superiores, enrojecimiento y flacidez de hojas inferiores. Plantas **D** y **E** fueron de MD2, el resto de Cayena.

located within the hsp70 gene, which encodes the heat shock 70-like protein into the ORF 3. PMWaV-1 sequence (589pb) corresponded to the 8.386 - 8.974 positions of the genome of a Hawaiian PMWaV-1 isolate (GenBank accession AF414119), and PMWaV-3 sequence (324pb) corresponded to the 7.004 - 7.327 positions of the genome of a Hawaiian PMWaV-3 isolate (GenBank accession DQ399259.2).

The isolate PMWaV-1Mexico showed a 100 % of identity with Cuban isolate and 98 % higher than the rest of isolates, except with Australian isolate (88.6 % of identity). By the other hand, the isolate PMWaV-3Mexico showed a 95.5 % identity higher with the rest of isolates in its group, except with Thailand isolate (88.2 % of identity). Figure 2 shows the similarity of Mexican isolates in relation with those reported in GenBank used for comparison. PMWaV-1Mexico and PMWaV-3Mexico grouped with groups 1 and 3, respectively, but no with groups 2, 4 and 5.

DISCUSSION

Mealybug wilt of pineapple (MWP) is a disease characterized by a severe dieback, reddening of leaves, wilt and collapse of mature plants associated with the viruses *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* (PMWaV-1), and *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) (Sether and Hu, 2000). In this study it was not observed in any of the plants analyzed the typical symptoms described in literature for MWP. PMWaV-1 was detected in a plant showing reduction of growth and irregular chlorotic spots on all leaves, especially the mature ones (Figure 1), these symptoms are different from those observed in field by Hu *et al.*, (1997) who also mentioned that a high percentage of plants with MWP are infected with PMWaV-1 while

jo se encuentran dentro del gen hsp70, que codifica la proteína de choque térmico 70 en el ORF 3. La secuencia PMWaV-1 (589pb) correspondió con las 8.386 - 8.974 posiciones del genoma de un aislado PMWaV-1 hawaiano (número de acceso AF414119), y la secuencia PMWaV-3 (324pb) correspondió con las 7.004 - 7.327 posiciones del genoma de un aislado hawaiano PMWaV-3 (número de acceso DQ399259.2).

El aislado PMWaV-1Mexico mostró un 100 % de identidad con el aislado cubano y 98 % más alto que el resto de los aislados, excepto con el aislado australiano (88.6 % de identidad). Por otra parte, el aislado PMWaV-3Mexico mostró un 95.5 % de identidad mayor con el resto de los aislados de su grupo, excepto con el aislado de Tailandia (88.2 % de identidad). La Figura 2 muestra la semejanza de los aislados mexicanos en relación con los reportados en GenBank usados para la comparación. PMWaV-1Mexico y PMWaV-3Mexico se agruparon con los grupos 1 y 3, respectivamente y no con los grupos 2, 4 y 5.

DISCUSIÓN

El marchitamiento asociado al piojo harinoso en piña (MaPHP) es una enfermedad que se caracteriza por un severo desecamiento, el enrojecimiento de las hojas, el marchitamiento y colapso de plantas maduras relacionados con los virus *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* (PMWaV-1), y *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) (Sether y Hu, 2000). En este estudio no se observó en ninguna de las plantas los síntomas típicos de MaPHP descritos en la literatura. Se detectó a PMWaV-1 en una planta que presentaba reducción de crecimiento y manchas cloróticas irregulares en todas las hojas, especialmente en las maduras (Figura 1). Estos síntomas son diferentes

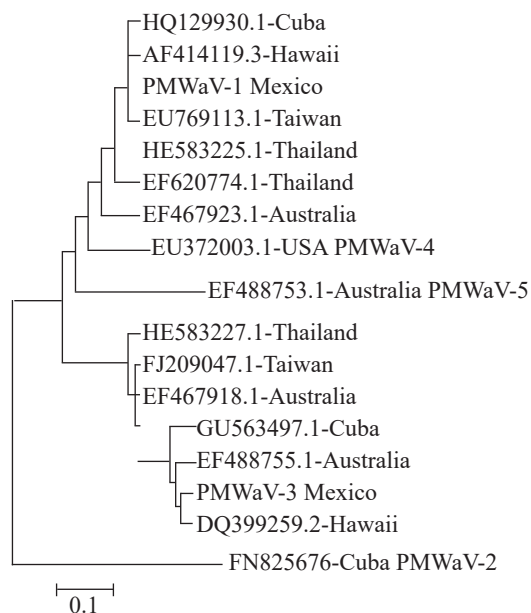


Figure 2. Neighbor-Joining tree of 17 PMWaV isolates based on partial sequences of hsp70 gene. Sequences align of isolates PMWaV-1Mexico and PMWaV-3Mexico with sequences of all PMWaV groups found in Genbank.

Figura 2. Árbol obtenido por el análisis Neighbor-Joining de aislados de 17 PMWaV basados en secuencias parciales del gen hsp70. Alineamiento de las secuencias de aislados PMWaV-1Mexico y PMWaV-3Mexico con secuencias de todos los grupos de PMWaV encontrados en Genbank.

others are asymptomatic. PMWaV-1 is limited to phloem; it is not transmitted mechanically and in field is spread by the mealybug *Dysmicoccus brevipes* and *D. neobrevipes* (Sether *et al.*, 1998). In this study did not find mealybugs in any of the sampled plants including the one that tested positive for PMWaV-1, however, this insect is a common pest in the area of study and this form of transmission in field is not discarded; it is possible that its spread may also occur in a vegetative form too (Sether *et al.*, 2005) since this virus causes asymptomatic infections (Hu *et al.*, 1997). In the area of study a reduction of the crop yield has not been observed; however, the presence of PMWaV-1 in the region can eventually affect the production if

to the observed by Hu *et al.*, (1997) quienes también mencionaron que un alto porcentaje de plantas con MaPHP están infectadas con PMWaV-1 mientras otras permaneces asintomáticas. PMWaV-1 se limita al floema; no es transmitido de manera mecánica y en el campo es transmitido por los piojos harinosos *Dysmicoccus brevipes* y *D. neobrevipes* (Sether *et al.*, 1998). En este estudio no se encontraron piojos harinosos en ninguna de las plantas muestreadas, incluyendo la que dio positivo para PMWaV-1, aunque este insecto es una plaga común en el área de estudio y esta forma de transmisión en el campo no queda descartada; es posible que su propagación también pueda ocurrir en una forma vegetativa (Sether *et al.*, 2005), ya que este virus causa infecciones asintomáticas (Hu *et al.*, 1997).

En el área de estudio no se ha observado una reducción en el rendimiento del cultivo; sin embargo, la presencia de PMWaV-1 en la región podría, a la larga, afectar la producción si el manejo de los vectores y el suministro del agua no son adecuados, ya que se ha comprobado que la infección por este virus y un riego limitado producen un efecto negativo (6.7 y 4.2 %, respectivamente) y un efecto acumulativo (13.4 %) sobre el tamaño y peso de la fruta de la piña (Sether y Hu, 2001). El aislado de PMWaV-1 detectado en este estudio es similar al reportado en Cuba (Figura 2), quizá debido al mayor intercambio comercial de material propagativo entre ambos países y menos similar a los aislados de Australia y Hawai debido a diferencias en los sistemas de producción, al material vegetal cultivado y condiciones ambientales predominantes en los tres casos (Sether *et al.*, 2010).

Así como el PMWaV-1, PMWaV-3 no induce la MaPHP por sí solo ni junto con la alimentación del de piojo harinoso en Hawai (Sether *et al.*, 2005) y no se sabe cuál es el efecto en la producción de piña (Sether *et al.*, 2009). Sólo una planta de la misma localidad que mostró diferentes síntomas

vector management and water supply is neglected since it has been shown that infection by this virus and limited irrigation produce a negative effect (6.7 and 4.2 %, respectively) and an additive effect (13.4 %) on size and weight of the pineapple fruit (Sether and Hu, 2001). The isolate of PMWaV-1 detected in this study is similar to that reported in Cuba (Figure 2) due perhaps to the highest trade exchange of propagative material between the two countries and least similar to isolates from Australia and Hawaii related to differences in systems production, cultivated plant material and prevailing environmental conditions in all three cases (Sether *et al.*, 2010).

Like PMWaV-1, PMWaV-3 does not induce MWP by itself or together with the mealybug feeding in Hawaii (Sether *et al.*, 2005) and it is unknown what is its effect on the production of pineapple (Sether *et al.*, 2009). Only one plant from the same location that showed different symptoms resulted positive for PMWaV-3. This plant had a reddish coloration in the central part of the mature leaves while young ones had a dark green, and in general did not show a decrease in growth nor flaccidity. As already mentioned, mealybug wilt of pineapple (MWP) is one of the most devastating diseases of this crop worldwide and has been associated with five different ampeloviruses (designated as *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* to 5) (Gambley *et al.*, 2008). However, it has been shown that the typical symptoms of this disease are only produced when infection simultaneously occurs of *Pineapple mealybug wilt associated virus-2* and feeding of *Dysmicoccus brevipes* and/or *D. neobrevipes* (Sether *et al.*, 1998). In this study mealybugs were not observed and PMWaV-2 was not detected in the samples analyzed, which is similar to that reported in Hawaii where the incidence of this virus ranges from 0 to 20 % depending on the production system and the hybrid used (Sether *et al.*, 2001)

salió positivo para PMWaV-3. Esta planta tenía una coloración roja en la parte central de las hojas maduras, mientras que las jóvenes tenían una verde oscura, y en general no mostraban una reducción en el crecimiento ni flacidez. Como ya se mencionó, el marchitamiento asociado al piojo harinoso en (Ma- PHP) es una de las enfermedades más devastadoras de este cultivo a nivel mundial y ha sido relacionado con cinco ampelovirus diferentes (designados como *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* al 5) (Gambley *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que los síntomas típicos de la enfermedad sólo se producen cuando ocurren simultáneamente la infección de *Pineapple mealybug wilt associated virus-2* y la alimentación de *Dysmicoccus brevipes* y/o *D. neobrevipes* (Sether *et al.*, 1998). En este estudio no se observaron piojos harinosos y no se detectó PMWaV-2 en las muestras analizadas, lo cual es similar a lo reportado en Hawaii, donde la incidencia de este virus va de 0 a 20 %, dependiendo del sistema de producción y el híbrido usado (Sether *et al.*, 2001) y puede causar pérdidas de hasta 100 % en frutas cuando está presente (Sether y Hu, 2001). Sin embargo, es necesario analizar un mayor número de muestras para conocer la situación de PMWaV-2 en el área de estudio. Como PMWaV-1 Mexico y PMWaV-3 Mexico son más distantes y menos similares a los aislados australiano y tailandés, respectivamente, podría sugerir que estos aislados tuvieron diferentes orígenes geográficos. Sin embargo, sería necesario estudiar otros genes y mayor número de aislados para confirmar esta hipótesis.

CONCLUSIONES

Pineapple mealybug wilt associated virus-1 (PMWaV-1) fue detectado en una planta de la piña que presentaba reducción de crecimiento y man-

and can cause up to 100 % losses of the fruits when it is present (Sether and Hu, 2001). However, it is necessary to analyze a larger number of samples to know the situation of PMWaV-2 in the area of study. Since PMWaV-1Mexico and PMWaV-3Mexico are more distant and less similar to the Australian and Thailand isolates, respectively, it could suggest that these isolates had different geographical origins. However, it would be necessary to study other genes and largest number of isolates to confirm this hypothesis.

CONCLUSIONS

Pineapple mealybug wilt associated virus-1 (PMWaV-1) was detected in a pineapple plant showing reduction of growth and irregular chlorotic leaf spots and *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) in one plant showed a reddish coloration in the center of mature leaves. The PMWaV-1Mexico isolate is similar to one reported in Cuba and somewhat different from that of Australia and Hawaii, while PMWaV-3Mexico isolate show genetic differences with other isolates of PMWaV-3 reported in the Genbank.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank for the partial funding granted by the Comité Veracruzano de Productores de Piña A.C. for conducting this investigation.

LITERATURE CITED

AFGC. 2002. Arabidopsis functional genomics consortium. Total RNA isolation. <http://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm>. Revised on Sept. 09 2010.

Borroto EG, Cintra M, González J, Borroto C and Oramas P. 1998. Pineapple plants (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) affected with pineapple mealybug wilt in Cuba. *Plant Disease* 82:263. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.2.263C>

chas cloróticas irregulares y *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) en una planta que presentó una coloración rojiza en el centro de hojas maduras. El aislado PMWaV-1Mexico es similar a uno reportado en Cuba y algo distinto de los de Australia y Hawai, mientras que el aislado PMWaV-3Mexico muestra diferencias con otros aislados de PMWaV-3 reportados en el Genbank.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al financiamiento parcial otorgado por el Comité Veracruzano de Productores de Piña A.C. para llevar a cabo esta investigación.

~~~~~ Fin de la versión en español ~~~~~

Carter W. 1945. Some etiological aspects of mealybug wilt. *Phytopathology* 35:305-315.

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

Hu JS, Sether DM, Liu XP, Wang M, Zee F and Ullman D. 1997. Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple closterovirus in Hawaii. *Plant Disease* 81:1150-1154. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.10.1150>

Sether DM, Ullman DE and Hu JS. 1998. Transmission of pineapple mealybug wilt associated virus by two species of mealybugs (*Dysmicoccus* spp.). *Phytopathology* 88:1224-1230. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.11.1224>

Sether DM and Hu JS. 2000. A closterovirus and mealybug exposure are both necessary components for mealybug wilt. *Phytopathology* 90:S71. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.6.S1>

Sether DM and Hu JS. 2001. The impact of *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* and reduced irrigation on pineapple yield. *Australasian Plant Pathology* 30:31-36. <http://dx.doi.org/10.1071/AP00060>

Sether DM, Karasev AV, Okumura C, Arakawa C, Zee F, Kislán MM, Busto JL and Hu JS. 2001. Differentiation, distribution, and elimination of two different Pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. *Plant Disease* 85:856-864. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.8.856>

Sether DM and Hu JS. 2002. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease.

- Phytopathology 92:928-935. <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO.2002.92.9.928>.
- Sether DM, Melzer MJ, Busto J, Zee F and Hu JS. 2005. Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. *Plant Disease* 89:450-456. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0450>
- Sether DM, Melzer MJ, Borth WB and Hu JS. 2009. Genome organization and phylogenetic relationship of *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* with family Closteroviridae members. *Virus Genes* 38: 414-420. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-009-0334-5>
- Sether DM, Borth WB, Melzer MJ and Hu J. 2010. Spatial and temporal incidences of Pineapple mealybug wilt-associated viruses in pineapple planting blocks. *Plant Disease* 94:196-200. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0196>