

PROPUESTA A PREMIO ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA 2017

**NUEVAS ESPECIES DE BEGOMOVIRUS QUE AFECTAN
CULTIVOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Y SOYA
(*Glycine max* (L.) Merr.) EN CUBA**

Unidad Ejecutora Principal del Resultado:

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

Autores: Lidia Chang-Sidorchuk, Yamila Martínez-Zubiaur,

Otros autores: Heidy González-Alvarez, Elvira Fiallo-Olivé, Jesús Navas-Castillo

Mayabeque 2017

TABLA DE CONTENIDO

I.	RESUMEN.....	3
II.	ACREDITACIÓN DEL APOORTE DE CADA AUTOR.....	4
III.	ACREDITACIÓN DE LA INTRODUCCIÓN DEL RESULTADO Y SU IMPACTO.....	5
IV.	COMUNICACIÓN CORTA.....	9
5	DESCRIPCIÓN CIENTÍFICO-TÉCNICA DETALLADA DEL RESULTADO....	13
5.1	Introducción.....	13
5.2	Prospección y análisis de diversidad de begomovirus en los cultivos de frijol y soya.....	15
5.3	Identificación de nuevas especies de begomovirus infectando el cultivo del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en Cuba.....	17
5.4	Primer informe del ADN-B de Tobacco leaf curl Cuba virus.....	19
5.5	Primer informe de Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus infectando del cultivo de soya (<i>Glycine max</i> (L) Merr.) en Cuba.....	20
5.6	Predominio de Bean golden yellow mosaic virus en el cultivo del frijol en localidades de la provincia de Mayabeque.....	21
5.7	Relaciones filogenéticas de los begomovirus identificados.....	23
5.8	Bibliografía consultada.....	27

PROPUESTA A PREMIO ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA 2017

TÍTULO: NUEVAS ESPECIES DE BEGOMOVIRUS QUE AFECTAN CULTIVOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Y SOYA (*Glycine max* (L.) Merr.) EN CUBA

AUTORES PRINCIPALES: Lidia Chang Sidorchuk¹, Yamila Martínez Zubiaur¹

OTROS AUTORES: Heidy González Álvarez¹, Elvira Fiallo Olivé², Jesús Navas Castillo²

COLABORADORES: 3

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Carretera de Tapaste y Autopista Nacional. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. ²Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental "La Mayora", 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, España.

I. RESUMEN

La presente propuesta reivindica la caracterización molecular de nuevos begomovirus que están afectando los cultivos de soya y frijol en el país, confirmando que la situación fitosanitaria presentada en los últimos años, fundamentalmente en el cultivo del frijol, está dada por una diversidad de begomovirus y no solo debida a Bean golden yellow mosaic virus (BGYMV).

El género *Begomovirus* es el más numeroso dentro de la familia *Geminiviridae*, sus especies son transmitidas por la mosca blanca *Bemisia tabaci* causando numerosas pérdidas a cultivos de gran importancia económica. En Cuba han sido detectadas varias especies de begomovirus afectando cultivos de importancia. En este trabajo se describe la caracterización de dos nuevas especies de begomovirus bipartitos infectando el cultivo del frijol: Common bean mottle virus y Common bean severe mosaic virus. Por otra parte, se determinó la presencia de Tobacco leaf curl Cuba virus en este cultivo con la primera identificación del componente B de esta especie y se estudió la variabilidad de aislados de Bean golden yellow mosaic virus en la provincia de Mayabeque a más de 15 años posteriores a su detección en el país. En el cultivo de soya se identificó por primera vez en Cuba la presencia de Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus.

Estos resultados constituyen una actualización de la situación fitosanitaria de ambos cultivos, con particular interés en el cultivo del frijol, donde hasta el momento los daños por virus son atribuidos a la presencia del BGYMV. Por otra parte, los resultados son tenidos en consideración para el fortalecimiento del programa de vigilancia fitosanitaria y manejo que se ejecuta en el país para el control del complejo mosca blanca-geminivirus en cultivos de interés económicos, así mismo para la evaluación de nuevos cultivares de frijol incorporando resistencia a estas nuevas especies virales.

Los resultados del trabajo se publicaron en revistas de alto factor de impacto como *Archives of Virology*, *Journal of Plant Pathology*, *Phytopathology* y en *Spanish Journal of Agriculture Research* en edición, también son recogidos en el capítulo de un libro publicado por el editorial *Springer*. Se han presentado en eventos nacionales e internacionales y ha obtenido un premio CITMA- Mayabeque 2016. Se cuentan con avales del MINAG, del programa de mejoramiento del cultivo de frijol y de personalidades extranjeras.

II. ACREDITACIÓN DEL APOORTE DE CADA AUTOR

Lidia Chang Sidorchuk¹ (37%): Realizó la colecta de muestras, trabajo molecular en laboratorio, análisis filogenéticos y de secuencias, así como su depósito en GenBank y análisis bioinformático de los datos. Escritura de las publicaciones. Escritura del premio.

Yamila Martínez Zubiaur¹ (27%): Líder del proyecto Nacional. Ha trabajado en la proyección del tema y de las investigaciones, diseño y ejecución de los experimentos, análisis de los datos y escritura de las publicaciones y del premio. Presentación de resultados en MINAG

Heidy Gonzalez Álvarez¹ (12%): Participó en la colecta de las muestras en el campo y en las extracciones de ADN. Trabajo molecular en laboratorio

Elvira Fiallo-Olivé² (12%): Ha trabajado en el diseño y ejecución de los experimentos, análisis de los datos y escritura de las publicaciones.

Jesús Navas Castillo² (12%): Ha trabajado en el diseño y ejecución de los experimentos, análisis de los datos y escritura de las publicaciones.

Colaboradores:

Yenne Marrero Álvarez¹: Colaboró en la ejecución y logística de los experimentos.

Andrés Martínez Márquez³: Director de Protección de Plantas – MINAG Mayabeque.

Antonio Enrique Joya Garcia³: Jefe del Departamento de Sanidad Vegetal, MINAG-Mayabeque

Filiación 1: CENSA; 2: IIHSM; 3: Dirección de la Agricultura, Mayabeque.

Autor para correspondencia:

Yamila Martínez Zubiaur
Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria
Aptado 10 CP-32700. Mayabeque.
Teléfono: 047 63014. Fax: 047 98104
Email: yamila@censa.edu.cu

III. ACREDITACIÓN DE LA INTRODUCCIÓN DEL RESULTADO Y SU IMPACTO

Los resultados obtenidos en este trabajo emanan de la ejecución del Proyecto Nacional "Preparación para el enfrentamiento de plagas emergentes y reglamentadas de la República de Cuba, en cultivos de solanáceas y granos" (P131LH003004) del Programa de Prioridad Nacional de Salud Animal y Vegetal del MINAG y una beca AECID de Cooperación para el Desarrollo.

Novedad e impacto de los resultados

Novedad Científica

- La identificación de Common bean mottle virus y Common bean severe mosaic virus como miembros del género *Begomovirus* constituyen un hallazgo para la ciencia y son aportes a la taxonomía del género *Begomovirus*, resultado presentado en una publicación de la revista *Archives of Virology*.
- Se informa por primera vez la presencia de las especies de begomovirus descritas en malezas (*Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus*) y en el cultivo del tabaco (*Tobacco leaf curl Cuba virus*), afectando los cultivos de soya y frijol respectivamente, este resultado forma parte de publicaciones editadas en las revistas *Journal of Plant Pathology* y en *Spanish Journal of Agricultural Research*.
- Por primera vez se identifica en Cuba la presencia de *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus*, lo que constituye un claro ejemplo del paso de un begomovirus previamente encontrado en malezas a cultivos de interés económico, este resultado evidencia el papel que juegan las arvenses y otras

plantas silvestres como fuente de emergencia de begomovirus que infectan cultivos hortícolas importantes.

- Identificación de TbLCCuV en el cultivo del frijol y secuenciación por primera vez del componente ADN-B de esta especie. La capacidad de este virus de colonizar a más de un hospedante constituye una amenaza epidemiológica para otros cultivos de importancia económica en el país, lo cual debe tenerse en cuenta en el manejo de la colindancia o vecindad de los cultivos así como su fecha de siembra.

Importancia Práctica

Este trabajo surge por la solicitud de directivos de la Dirección Provincial de Agricultura de Mayabeque por el incremento, desde 2013, de la incidencia de síntomas severos asociados a virus en áreas de producción de frijol y que han dado al traste con la disminución de los rendimientos en las áreas afectadas, por lo cual estos virus identificados, justifican la necesidad de implementar y/o retomar los programas de manejo del complejo mosca blanca-geminivirus en estos cultivos de interés económico.

Por otra parte, en Cuba los programas de mejoramiento del frijol desde finales de los años 90 e inicio del nuevo siglo, trabajaron por la incorporación de genes de resistencia al begomovirus BGYMV en cultivares nacionales. Esto permitió disminuir su incidencia en el campo y por tanto disminuir las pérdidas, sin embargo, el incremento de los síntomas observados en los últimos años y los resultados de este trabajo confirman la necesidad de que los programas de mejoramiento del cultivo del

frijol incorporen, además del BGYMV, las nuevas especies descritas dentro de sus estrategias de obtención y evaluación de cultivares.

A partir de este trabajo se demuestra que el uso de las tecnologías moleculares en la Sanidad Vegetal en Cuba constituyen herramientas para apoyar las estrategias de manejo de plagas dentro de los programas de producción de alimentos importantes para la sustitución de importaciones en el país y priorizados por el MINAG.

Estos resultados serán de gran utilidad para crear medios de diagnóstico para las nuevas especies de begomovirus a partir del conocimiento de las secuencias nucleotídicas de sus genomas lo que permitirá realizar estudios de distribución nacional de los begomovirus identificados.

Publicaciones

- Chang-Sidorchuk, L., González, H., Martínez-Zubiaur, Y., Navas-Castillo, J., & Fiallo-Olivé, E. (2016). First report of Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus infecting soybean in Cuba. *Journal of Plant Pathology*, 98(1), 174. Factor de Impacto: 0.6
- Chang-Sidorchuk, L., González-Alvarez, H., Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., & Martínez-Zubiaur, Y. (2017). Complete genome sequences of two novel bipartite begomoviruses infecting common bean in Cuba. *Archives of virology*, 162 (5), 1431-1433. Factor de Impacto: 2.058
- Yamila Martínez-Zubiaur, Lidia Chang-Sidorchuk, and Heidy González-Álvarez. Begomoviruses in Cuba: Brief History and Current Status. In: Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017 S. Saxena, A.K. Tiwari (eds.), Begomoviruses: Occurrence and Management in Asia and Africa, DOI 10.1007/978-981-10-5984-1_19.
- Yamila Martínez-Zubiaur, Lidia Chang-Sidorchuk, Heidy González-Alvarez , Gloria González-Arias, Natalia Barboza, Jesús Navas-Castillo, Elvira Fiallo-

Olivé. Emergence and impact of viral diseases vector-borne in Cuban agriculture. *Phytopathology*. 107:S4.7. Factor de Impacto: 2.896

- Chang-Sidorchuk, L., González, H., Martínez-Zubiaur, Y., Navas-Castillo, J., & Fiallo-Olivé, E. (2017). Begomoviruses infecting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production areas in Cuba. *SJAR*. En edición. Factor de Impacto: 0.873

Principales eventos en los cuales se han divulgado los resultados

- II Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria. 2015. Evidencia de variabilidad molecular de begomovirus que afectan el cultivo del frijol en Cuba.
- Bioinformatics Workshop on Viral Evolution and Molecular Epidemiology. Caracterización de virus de plantas y sus insectos vectores: un desafío para la agricultura sostenible. 2016.
- XX Congreso Científico del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Nuevos begomovirus infectando cultivos de soya y frijol en cuba
- Congreso de la División Caribe de la Sociedad Americana de Fitopatología. 2017. New begomoviruses infecting common bean and soybean in Cuba.
- VIII Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal 2017. Nuevos begomovirus infectando cultivos de soya y frijol en cuba

Premios anteriores

CITMA Mayabeque 2016.

Avales

Se cuenta con los avales de directivos del MINAG-Mayabeque que han estado vinculados y colaborando como principales beneficiarios de los resultados mostrados en este trabajo (Andrés Martínez Márquez y Antonio Enrique Joya García).

Aval del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Aval del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora, España.

IV. COMUNICACIÓN CORTA

NUEVAS ESPECIES DE BEGOMOVIRUS QUE AFECTAN CULTIVOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Y SOYA (*Glycine max* (L.) Merr.) EN CUBA

Autores: Lidia Chang-Sidorchuk¹, Yamila Martínez-Zubiaur¹

Otros autores: Heidy González-Alvarez¹, Elvira Fiallo-Olivé², Jesús Navas-Castillo²

Colaboradores: 3

Filiación 1: CENSA; 2: IIHSM

La presente propuesta reivindica los resultados obtenidos en la caracterización molecular de nuevos begomovirus, que están afectando los cultivos de soya y frijol, así como la determinación de la organización genómica de las nuevas especies identificadas. Con este estudio se actualiza la situación fitosanitaria del cultivo del frijol, atribuida desde el año 2001 solamente a la presencia del BGYMV. Sin embargo, actualmente se evidencia un incremento de síntomas en áreas de producción, demostrándose con este trabajo la diversidad de begomovirus incidiendo en la situación fitosanitaria de estos cultivos.

Los begomovirus son patógenos de plantas que en las últimas décadas han causado importantes pérdidas a cultivos de interés económico en regiones tropicales y subtropicales. El género *Begomovirus* es el más numeroso y de mayor importancia de la familia *Geminiviridae* (Brown y col., 2015). Sus miembros poseen un genoma circular encapsidado en partículas geminadas y son transmitidos por moscas blancas (*Bemisia tabaci*). El genoma puede ser monopartito o bipartito (Fondong, 2013).

En Cuba han sido detectadas numerosas especies de begomovirus afectando cultivos de gran importancia económica (Echemendía y col., 2001; Martínez-Zubiaur y col., 2002; Morán y col., 2006). Entre los años 2013 y 2016 se evidenciaron síntomas relacionados a la presencia de begomovirus, pero con mayor severidad, en campos comerciales de soya y frijol en la provincia de Mayabeque. Se colectaron muestras vegetales que mostraban síntomas tales como mosaicos, moteados y reducción del área foliar.

A partir del ADN extraído se realizó la amplificación por círculo rodante y posteriormente el análisis con enzimas de restricción pudo confirmar la presencia de varios begomovirus bipartitos. Se seleccionaron para la clonación y secuenciación de los genomas virales las muestras 6, 8, 24, 96, 99, 127 y 148. La clonación de los componentes virales se llevó a cabo en el vector pBluescript II SK (+) en *Escherichia coli* DH5α. Los clones seleccionados se secuenciaron obteniéndose el genoma

completo de las entidades virales. Para el análisis de secuencias se utilizaron los programas bioinformáticos correspondientes (Tamura y col., 2013; Muhire y col., 2014).

Los componentes ADN-A y ADN-B obtenidos de las siete muestras en estudio presentaron las características típicas de los begomovirus del Nuevo Mundo. El begomovirus aislado de la muestra 6 contiene un ADN-A de 2631 nt (número de acceso al GenBank: KX011473) que presenta el mayor porcentaje de identidad de 86.5% con *Rhynchosia mild mosaic virus* (FJ944019), un begomovirus encontrado infectando malezas de fabáceas como *Rhynchosia minima* en Puerto Rico (Brown and Idris, 2009). El ADN-B (2604 nt, KX011474) presentó el mayor porcentaje (77%) con el mismo begomovirus. Ambos componentes poseen una región común de 178 nt con una identidad de 92% indicando que ambos componentes virales constituyen pares cognados.

Los componentes ADN-A de las muestras 96 (KX011476) y 99 (KX011477) presentan un porcentaje de identidad de 94.6% entre ellas indicando la presencia de la misma especie viral en ambas muestras. El mayor porcentaje de identidad del ADN-A (87%) fue con *Rhynchosia golden mosaic Havana virus* (HM236368) y del ADN-B con *Rhynchosia mild mosaic virus* (FJ944020). La región común de ambos componente virales presentó un porcentaje de identidad de 98%.

El ADN-A de la muestra 8 (KX011471) presenta el mayor porcentaje de identidad (97.8%) con *Tobacco leaf curl Cuba virus* (TbLCCuV) (AM050143), un begomovirus descrito en Cuba infectando el cultivo del tabaco (Morán y col., 2006) y recientemente se ha encontrado infectando áreas de producción de frijol de la provincia de Sancti Spíritus (Leyva y col., 2016). El ADN-B muestra el mayor porcentaje de identidad (82%) con *Wissadula golden mosaic virus* (GQ355487). Ambos componentes virales presentan una región común de 203 nucleótidos con una identidad del 98.5%.

El begomovirus presente en la muestra 24 de soya presentó un ADN-A (KT381193) con un alto porcentaje de identidad (93%) con *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus* (RhGMYuV) (EU021216), un begomovirus encontrado en malezas como *Rhynchosia minima* y *Desmonium* sp. en México. El DNA-B (KT381194) mostró el mayor porcentaje de identidad (91%) con RhYMYuV (FJ792608) y con *Rhynchosia rugose golden mosaic virus* (HM236371).

A partir de las muestras 127 y 148 se obtuvieron las secuencias completas del componente A viral, con una talla de 2644 (No de acceso al GenBank, KX185517) y 2645 (KX185518) nucleótidos respectivamente. Los análisis para el ADN-A con el

programa SDT muestran que ambos aislados tienen un porcentaje de similitud del 98% con Bean golden yellow mosaic virus (AJ544531) (Echemendía y col., 2001).

Según el criterio definido por el Grupo de Estudio de la familia *Geminiviridae* del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV), el valor de corte del porcentaje de identidad nucleotídica del ADN-A para la demarcación de las especies en el género Begomovirus es del 91%. (Brown y col., 2015). De acuerdo a este criterio, en este trabajo se describen dos nuevas especies: Common bean mottle virus (muestra 6) y Common bean severe mosaic virus (muestras 96 y 99) afectando el cultivo del frijol, así como dos aislados de begomovirus previamente descritos: Bean golden yellow mosaic virus (muestra 127) y Tobacco leaf curl Cuba virus (muestra 8). En el cultivo de soya (muestra 24) se identificó por primera vez en Cuba la presencia de Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus.

Estos resultados constituyen un claro ejemplo del paso de un begomovirus previamente encontrado en malezas a cultivos de interés económico, lo que hace evidente una vez más el papel que juegan las arvenses y otras plantas silvestres como fuente de emergencia de begomovirus que infectan cultivos hortícolas importantes. El análisis filogenético de ambos componentes genómicos de todos los begomovirus identificados puso de manifiesto sus estrechas relaciones con otros aislamientos en regiones cercanas, fundamentalmente con virus de la región del Caribe.

La emergencia de begomovirus en fabáceas ha sido informada en varios países de América Latina en los últimos años (Fiallo-Olivé y col., 2013; Idris y col., 2003). Estos estudios fortalecerán los programas de vigilancia fitosanitaria y manejo que se ejecutan en el país para el control del complejo mosca blanca-geminivirus en cultivos de interés económicos.

Por otra parte, entre las medidas de control que deben ser tomadas, también es necesaria la introducción de cultivares resistentes. En Cuba los programas de mejoramiento del frijol desde finales de los años 90 e inicio del nuevo siglo, trabajaron por la incorporación de genes de resistencia al begomovirus BGYMV en cultivares nacionales (Echemendía y col., 2012). Esto permitió disminuir su incidencia en campo y por tanto disminuir las pérdidas, sin embargo, el incremento de los síntomas observados en los últimos años y los resultados de este trabajo confirman la necesidad de que los programas de mejoramiento del cultivo del frijol incorporen, además del BGYMV, estas nuevas especies dentro de sus estrategias de obtención y evaluación de cultivares.

Bibliografía consultada

1. Brown, J.K., Idris, A.M., 2009. A new, virulent, broad host range bean-infecting begomovirus from Puerto Rico: Rhynchosia mild mosaic virus. *Annu Rep Bean Improv Coop* 52:30
2. Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R.W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., 2015. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of virology* 160, 1593-1619.
3. Echemendía, A., Ramos, P., Peral, R., Fuentes, A., González, G., Sanpedro, J., Morales, F., 2001. Cuban isolate of Bean golden yellow mosaic virus is a Member of the Mesoamerican BGYMV Group. *Plant Disease* 85, 1030-1030.
4. Fiallo-Olivé, E., Márquez-Martín, B., Hassan, I., Chirinos, D.T., Geraud-Pouey, F., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2013. Complete genome sequences of two novel begomoviruses infecting common bean in Venezuela. *Archives of virology* 158, 723-727.
5. Fondong, V.N., 2013. Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology* 14, 635-649.
6. Idris, A., Hiebert, E., Bird, J., Brown, J., 2003. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. *Phytopathology* 93, 774-783.
7. Leyva, R.M., Quiñones, M., Acosta, K.I., Piñol, B., Xavier, C.D., Zerbini, F.M., 2016. First report of Tobacco leaf curl Cuba virus infecting common bean in Cuba. *New Disease Reports* 33.
8. Martínez-Zubiaur, Y., Quiñones, M., Fonseca, D., Potter, J., Maxwell, D., 2002. First report of Tomato yellow leaf curl virus associated with beans, *Phaseolus vulgaris*, in Cuba. *Plant Disease* 86, 814-814.
9. Morán, Y., Ramos, P., Domínguez, M., Fuentes, A., Sánchez, Y., Crespo, J., 2006. Tobacco leaf curl Cuba virus, a new begomovirus infecting tobacco (*Nicotiana tabacum*) in Cuba. *Plant Pathology* 55, 570-570.
10. Muhire, B.M., Varsani, A., Martin, D.P., 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE* 9, e108277.
11. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, mst197.

V. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICO-TÉCNICA DETALLADA DEL RESULTADO

5.1 Introducción

La familia *Geminiviridae* incluye nueve géneros establecidos en base a la filogenia, organización del genoma, vector y rango de hospedante (Varsani y col., 2016). El género *Begomovirus* es el más numeroso y de mayor importancia de la familia (Brown y col., 2015), actualmente cuenta con 322 especies (Zerbini y col., 2017). Sus miembros poseen un genoma circular encapsidado en partículas geminadas y son transmitidos por moscas blancas (*Bemisia tabaci*) de manera persistente y circulativa (Rana y col., 2016).

El genoma de los begomovirus puede ser monopartito o bipartito y ambos componentes genómicos de begomovirus bipartitos se denominan ADN-A y ADN-B. El componente A presenta seis marcos de lectura abiertos (ORFs), dos en la cadena viral (AV1 y AV2) y cuatro en la cadena complementaria (AC1, AC2, AC3, AC4). El componente B posee dos ORFs, uno en la cadena viral (BV1) y otro en la complementaria (BC1). Los begomovirus bipartitos del Nuevo Mundo carecen del ORF AV2. Las secuencias de los dos componentes genómicos de los begomovirus bipartitos son desiguales, excepto una parte denominada región común (RC) de aproximadamente 200 nucleótidos que incluye el origen de replicación (Fondong, 2013).

En las últimas décadas los begomovirus han causado importantes pérdidas a cultivos de interés económico, en regiones tropicales y subtropicales. En Cuba, se han referido enfermedades asociadas a begomovirus desde mediados de la década de 1970 en el cultivo del frijol (Blanco y col., 1984). A finales de la década de 1990 el

tomate también resultó afectado por varios begomovirus bipartitos (Martínez y col., 1998; Ramos y col., 1997). La presencia de begomovirus bipartitos también se ha descrito en otros cultivos en el país, entre ellos el tabaco (Domínguez y col., 2009; Morán y col., 2006), la papa (Cordero y col., 2003) y el pimiento (Martínez y col., 2006a), así como en arvenses (Echemendía y col., 2004; Martínez y col., 2006b; Fiallo-Olivé y col., 2010). Su identificación generalmente ha estado asociada a incrementos de las poblaciones de mosca blanca (Fiallo-Olivé y col., 2010).

En muchos países de América Latina, incluyendo Cuba, el frijol común constituye un cultivo de gran importancia económica, que forma parte de la dieta básica. Aunque se conoce que los begomovirus son un factor limitante en la producción de frijol en muchos países, no existe suficiente información disponible sobre la diversidad de especies que infectan este cultivo en Cuba.

Estudios previos han demostrado la presencia de Bean golden yellow mosaic virus (BGYMV), Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) y Tobacco leaf curl Cuba virus (TbLCCuV), infectando este cultivo (Echemendía y col., 2001; Martínez-Zubiaur y col., 2002, Leyva y col., 2016). Sin embargo, los últimos años, en las principales áreas productoras de frijol y soya de la provincia de Mayabeque se ha observado un incremento de la prevalencia de diversos síntomas de amarillamiento y mosaicos, típicos de la presencia de begomovirus.

El objetivo de este estudio es identificar los begomovirus presentes en las principales localidades de producción de estas leguminosas en la provincia de Mayabeque.

5.2 Prospección y análisis de diversidad de begomovirus en los cultivos de frijol y soya

Entre los años 2013 y 2015 se realizó la colecta de un total de muestras de frijol y soya con síntomas de moteado y mosaico de las principales zonas productoras de San José de las Lajas, Batabanó, Quivicán, Güines y Melena, de la provincia de Mayabeque (Fig. 1).

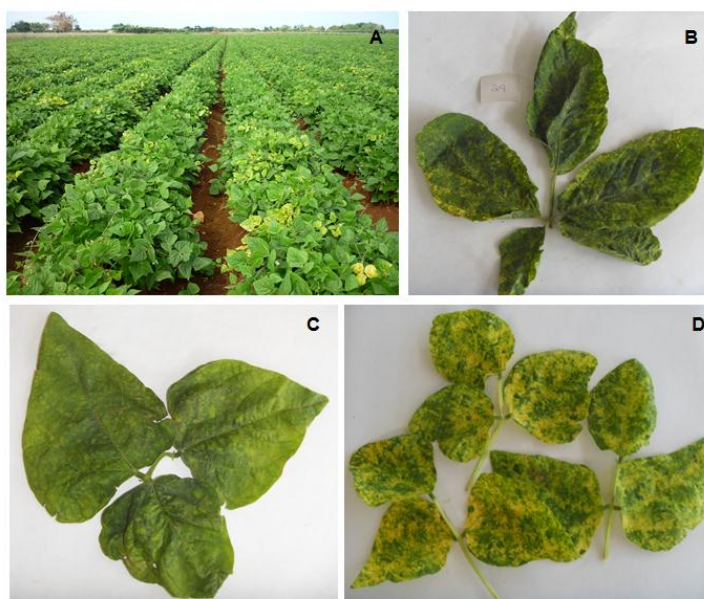


Figura 1. Cultivo del frijol con síntomas típicos de la presencia de begomovirus (A). Síntomas foliares observados en las muestras de soya 24 (B) y frijol: 6 (C) y 99 (D) analizadas en este trabajo.

La extracción de ADN de las muestras vegetales se realizó con el método descrito por Permingeat y colaboradores (1998). A partir del ADN extraído se realizó la amplificación por círculo rodante (ACR) utilizando ϕ 29 DNA polimerasa (TempliPhi kit, GE Healthcare). El producto de amplificación se digirió primeramente con la enzima *Hpa*II y luego de comprobar la presencia de genomas begomovirales las

muestras de analizaron con varias enzimas de restricción de corte único: *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sal*I, *Nco*I, *Sac*I, *Sal*I, *Eco*RV y *Pst*I.

La digestión con estas enzimas mostró patrones de restricción que sugirieron la presencia de varias especies virales en las muestras analizadas (Figura 2). Se seleccionaron para la clonación y posterior secuenciación de los genomas virales de las siguientes muestras: 6, 8, 24, 96, 99, 127 y 148.

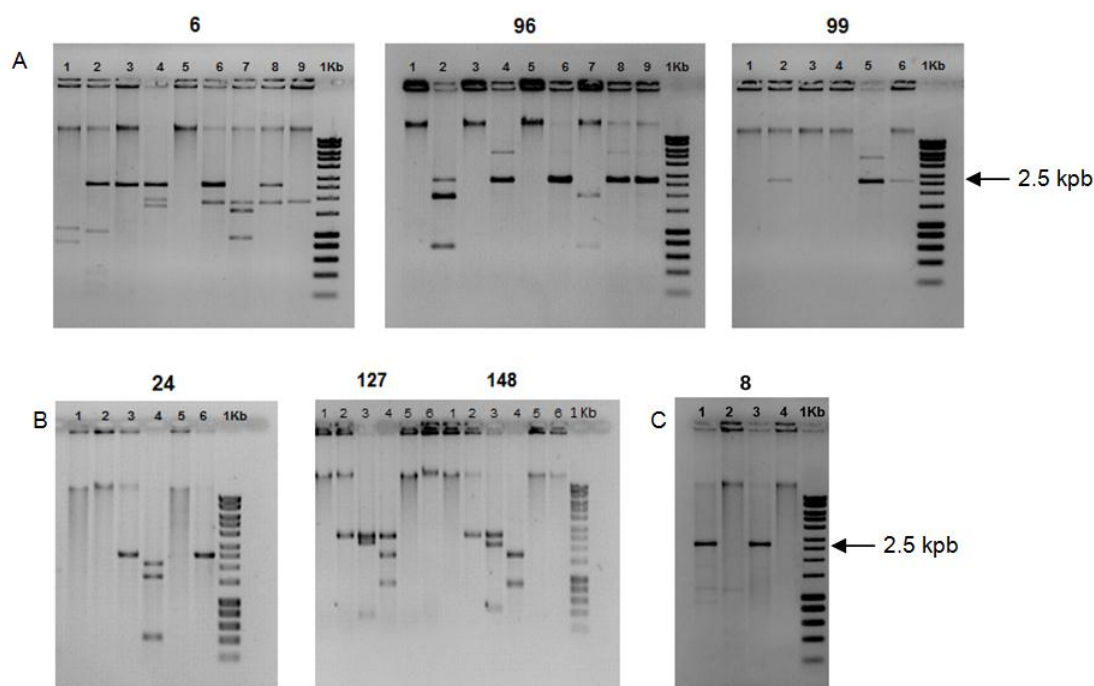


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del ADN de las muestras 6, 96, 99, 24, 127, 148 y 8 amplificadas por círculo rodante y digeridos con diferentes enzimas de restricción. **A:** muestras 6, 96 y 99 digeridas con las enzimas *Bam*HI (1), *Eco*RI (2), *Hind*III (3), *Nco*I (4), *Nhe*I (5), *Sac*I (6), *Pst*I (7), *Sal*I (8), *Eco*RV (9). **B:** muestras 24, 127 y 148 digeridas con las enzimas *Bam*HI (1), *Eco*RI (2), *Hind*III (3), *Nco*I (4), *Nhe*I (5) y *Sac*I (6). **C:** Muestra 8 digerida con *Bam*HI (1), *Eco*RI (2), *Pst*I (3), *Nhe*I (4).

La clonación de los componentes virales se llevó a cabo en el vector pBluescript II SK (+) en *Escherichia coli* DH5 α . Los clones seleccionados se secuenciaron

obteniéndose el genoma completo de las entidades virales. Las secuencias obtenidas se ensamblaron con el programa SeqMan (Lasergene 7). Según el criterio de demarcación de especies de begomovirus se realizó el análisis con el programa SDT (Sequence Demarcation Tool) (Muhire y col., 2014). Las relaciones filogenéticas se analizaron con el programa MEGA 6 (Tamura y col., 2013), para la obtención del árbol filogenético se tomó un valor de remuestreo de 1000.

Al ensamblarse las secuencias de cada uno de los clones correspondientes a los genomas virales presentes en las muestras analizadas, se pudo comprobar que todos ellos correspondían a begomovirus bipartitos con la estructura genómica típica del Nuevo Mundo.

5.3 Identificación de nuevas especies de begomovirus infectando el cultivo del frijol en Cuba

El begomovirus aislado de la muestra 6 de frijol contiene un ADN-A de 2631 nt (número de acceso al GenBank KX011473) que presenta el mayor porcentaje de identidad de 86.5% con *Rhynchosia mild mosaic virus* (FJ944019), un begomovirus encontrado infectando malezas de fabáceas como *Rhynchosia minima* en Puerto Rico (Brown and Idris, 2009). El ADN-B (2604 nt, KX011474) presentó el mayor porcentaje (77%) con el mismo begomovirus.

Ambos componentes poseen una región común de 178 nt con una identidad de 92%. La región común comprende el origen de la replicación, que está compuesto por una estructura en forma de horquilla y el nanonucleótido TAATATTAC. En esta región se identificaron dos copias repetidas (iterones) del sitio de unión de la proteína Rep, ATTGGTGT, y dos copias invertidas (ACACCAAT y ACACCAAaT).

Los componentes ADN-A de las muestras 96 (KX011476) y 99 (KX011477) presentan un porcentaje de identidad de 94.6% entre ellas indicando la presencia de la misma especie viral en ambas muestras. Los componentes B de ambas muestras (KX096981, KX096982) mostraron un 88% de identidad entre ellos. El mayor porcentaje de identidad del ADN-A (87%) fue con Rhynchosia golden mosaic Havana virus (HM236368), un begomovirus que infecta *R. minima* en Cuba y del ADN-B con Rhynchosia mild mosaic virus (FJ944020). La región común presentó un porcentaje de identidad de 98% que contiene dos copias de iterones idénticos adyacentes a la caja TATA (ATTGGTG) y uno invertido (CACCgAT) corriente abajo del nanonucleótido.

Según el criterio definido por el Grupo de Estudio de la familia *Geminiviridae* del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV), el valor de corte del porcentaje de identidad nucleotídica del ADN-A para la demarcación de las especies en el género *Begomovirus* es del 91% (Brown y col., 2015). De acuerdo a este criterio, en este trabajo se describen dos nuevas especies afectando el cultivo del frijol: Common bean mottle virus (muestra 6) y Common bean severe mosaic virus (muestras 96 y 99).

El análisis con el programa para detección de recombinación RDP 4 (Martin y col., 2015) mostró la naturaleza recombinante de las dos nuevas especies de begomovirus identificadas. En CBMoV se detectó un punto de recombinación entre los nucleótidos 1406 y 1919 con Blechnum interveinal chlorosis virus (BleICV, JX827487) como mayor parental identificado por cinco métodos con los siguientes valores de P: RDP, 1.67×10^{-04} ; GENECONV, 2.127×10^{-03} ; Max Chi, 8.817×10^{-05} ;

Chimaera, 2.944×10^{-04} y SiScan, 1.165×10^{-15} . En el caso de CBSMV (KX011476), se estableció un punto de recombinación entre los nucleótidos 1754 y 2287 con Euphorbia mosaic virus (EuMV, AM886131) como mayor parental por cuatro métodos con los siguientes valores de P: RDP, 1.8×10^{-02} ; Max Chi, 5.074×10^{-07} ; Chimaera, 3.339×10^{-04} and SiScan, 7.178×10^{-15} . En ambos virus el menor parental resultó desconocido.

La descripción de las nuevas especies de begomovirus hace evidente una vez más la gran diversidad de begomovirus que caracteriza a la región de América Latina (Albuquerque y col., 2010). Esto se debe en gran medida a fuerzas evolutivas como la mutación, la recombinación y el intercambio de componentes genómicos (pseudorrecombinación), así como por la introducción en América de poblaciones de Middle East Asia Minor I de mosca blanca *B. tabaci* (Navas-Castillo y col., 2011).

5.4 Primer informe del ADN-B de Tobacco leaf curl Cuba virus

El ADN-A de la muestra 8 de frijol (KX011471) presentó el mayor porcentaje de identidad (97.8%) con Tobacco leaf curl Cuba virus (TbLCCuV) (AM050143), un begomovirus descrito en Cuba infectando el cultivo del tabaco (Morán y col., 2006). Según los criterios de demarcación para las especies de begomovirus (Brown y col., 2015) el begomovirus identificado en la muestra 8 constituye un aislado de TbLCCuV, que se describió por primera vez infectando el cultivo del tabaco en Cuba (Morán y col., 2006) y también se ha encontrado infectando áreas de producción de frijol de la provincia de Sancti Spíritus (Leyva y col., 2016). Sin embargo, ADN-B muestra el mayor porcentaje de identidad (82%) con Wissadula golden mosaic virus (GQ355487).

Ambos componentes virales presentan una región común de 203 nucleótidos con una identidad del 98.5% entre ellos y cinco copias de iterones idénticos GGGGG (tres invertidos, CCCCC), indicando que ambos componentes virales encontrados en la muestra 8 constituyen pares cognados. El componente B de esta especie no ha sido informado en los trabajos previos por lo que este trabajo constituye la primera identificación del ADN-B de TBLCCuV.

La capacidad de este virus de colonizar a más de un hospedante podría constituir una amenaza epidemiológica para otros cultivos de importancia económica en el país, lo cual debe tenerse en cuenta en el manejo de la colindancia o vecindad de los cultivos así como su fecha de siembra.

5.5 Primer informe de Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus infectando del cultivo de soya (*Glycine max* (L.) Merr.) en Cuba

La soya constituye en la actualidad un cultivo con una de las fuentes de aceite y proteína vegetal de mayor importancia en el mundo. Durante los últimos años, el cultivo de la soya ha cobrado auge en Cuba, siendo cada vez más extensas las superficies dedicadas al cultivo, con el propósito fundamental de producir alimentos para animales y para el consumo humano (Maqueira-López y col., 2016). Sin embargo, se han observado en las plantaciones síntomas típicos de la presencia de begomovirus, aunque no se había identificado molecularmente hasta la fecha la especie de begomovirus que se encuentra afectando este cultivo.

El begomovirus identificado, a partir de este trabajo, en la muestra 24 de soya presentó de un ADN-A (KT381193) con un alto porcentaje de identidad (93%) con Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus (RhGMYuV) (EU021216), un begomovirus

encontrado en malezas como *Rhynchosia minima* y *Desmonium* sp. en México (Hernández-Zepeda y col., 2010). El DNA-B (KT381194) mostró el mayor porcentaje de identidad (91%) con RhYMYuV (FJ792608) y con *Rhynchosia rugose golden mosaic virus* (HM236371).

Ambos componentes del begomovirus identificado presentan una región común de 159 nt con una identidad del 89.6% y cuatro copias de iterones idénticos GGAGTCC (uno invertido, GGACTCC). La identificación por primera vez en Cuba de la presencia de *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus* constituye un claro ejemplo del paso de un begomovirus previamente encontrado en malezas a cultivos de interés económico. En Cuba se han identificado otros casos de begomovirus descritos en arvenses que terminan infectando plantas cultivadas. Tal es el caso de *Euphorbia mosaic virus* (EuMV), inicialmente encontrado en varias especies del género *Euphorbia* en Brasil (Costa y Bennett, 1950) y Puerto Rico (Bird y col., 1975) y que luego se encontró en plantas de tabaco en Cuba (Fiallo-Olivé y col., 2010). Esta situación hace evidente una vez más el papel que juegan las arvenses y otras plantas silvestres como fuente de emergencia de begomovirus que infectan cultivos hortícolas importantes.

5.6 Predominio de Bean golden yellow mosaic virus en el cultivo del frijol en localidades de la provincia de Mayabeque

A partir de las muestras 127 y 148 se obtuvieron las secuencias completas del componente A viral, con una talla de 2644 (No de acceso al GenBank, KX185517) y 2645 (KX185518) nucleótidos respectivamente. Los análisis para el ADN-A con el

programa SDT muestran que ambos aislados tienen un porcentaje de similitud del 98% con Bean golden yellow mosaic virus (AJ544531) (Echemendía y col., 2001).

Este virus ha causado graves pérdidas económicas en el cultivo del frijol en Cuba desde que se identificaron los primeros síntomas en 1970 (Blanco y col., 1984). En las campañas de los años 89-90 y 90-91, el BGYMV provocó porcentajes máximos de infección en la provincias de Pinar del Río, Matanzas y Holguín, que conllevó a la destrucción de más de 1000 ha del cultivo. Posteriormente la enfermedad alcanzó afectaciones del 90% y se convirtió en el principal patógeno viral del frijol en Cuba, lo que llevó a la introducción en el país de cultivares mejorados genéticamente con resistencia a mosaico dorado (Echemendía y col., 2012).

A nivel mundial, esta es una de las enfermedades más peligrosas que afecta al frijol común en Centro América y el Caribe se ha encontrado en República Dominicana, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua y la Florida (Mather y col., 2003; Morales, 2005).

Con el objetivo de determinar la distribución del BGYMV en localidades de la provincia de Mayabeque (San José de las Lajas, Batabanó, Quivicán, Güines y Melena) se seleccionaron un total de 108 muestras para el análisis por hibridación de ácidos nucleicos con una sonda específica. La sonda se confeccionó a partir de la región intergénica de la secuencia viral obtenida en la muestra 127 con los cebadores denominados MA2163 (5'-GTAAATATGCGAGTGTCTCCG-3') y MA2162 (5'-CTGGACTTACACGTGGAATGG-3'). El marcaje no radiactivo de la sonda se realizó según las instrucciones del juego de reactivos PCR DIG Probe synthesis Kit (Roche). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo con un

programa que consistió en la desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguidos de 30 ciclos de reacción (1 min a 94°C, 1 min a 57°C, 50 segundos a 72°C) y 5 min a 72°C). Del total de plantas de frijol colectadas en este estudio, 64 (59,26%) resultaron positivas cuando se analizaron para detectar la presencia de BGYMV por hibridación. Las localidades de Melena del Sur y Batabanó presentaron los mayores valores de infección (95 y 100% respectivamente), mientras el municipio de San José de las Lajas presentó los menores porcentajes (12.12%).

La amplia distribución de BGYMV en la provincia de Mayabeque está dada en gran medida por la presencia de altas de poblaciones de *Middle East Asia Minor 1* de *B. tabaci*, que han sido identificadas en Cuba desde hace algunos años (Muñiz y col., 2006, Muniz y col., 2011). Se conoce que esta especie, por ser más agresiva, desde mediados de los años 1980s ha desplazado a la especie local *New World 1* en América (Morales, 2010), la emergencia de la mayoría de los begomovirus ha ocurrido en los últimos 20 años como consecuencia de la dispersión global de *Middle East Asia Minor 1*.

5.7 Relaciones filogenéticas de los begomovirus identificados

El análisis filogenético llevado a cabo con ambos componentes genómicos de los begomovirus identificados puso de manifiesto sus estrechas relaciones con otros aislamientos en regiones cercanas, fundamentalmente con virus de la región del Caribe (Figura 3).

Estos begomovirus se distribuyen filogenéticamente en diferentes grupos, lo que evidenció la diversidad existente en las poblaciones de Cuba.

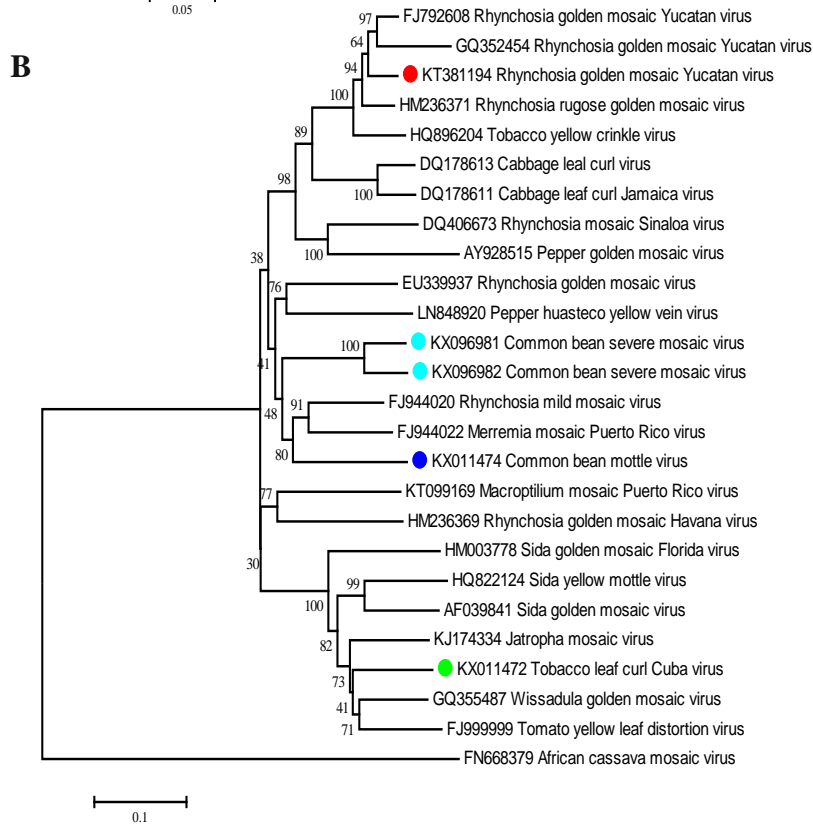
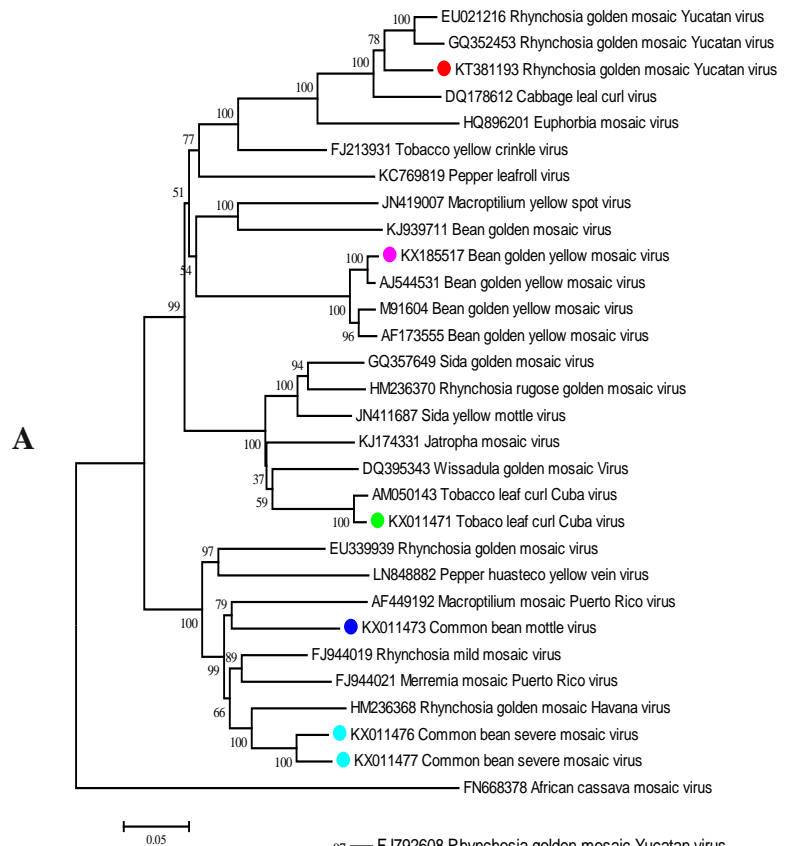


Figura 3. Árboles filogenéticos basados en el alineamiento de las secuencias de los genomas completos de los componentes ADN-A (A) y ADN-B (B) de los aislados obtenidos en este trabajo con aislados de begomovirus seleccionados del GenBank. Los árboles se obtuvieron mediante el método *Neighbor joining* en el programa MEGA 6. Los números de los nodos representan los valores de remuestreo (1000 réplicas). African cassava mosaic virus se usó como grupo externo.

Es interesante destacar que a pesar de la aparición de nuevas especies de begomovirus bipartitos infectando el cultivo del frijol en áreas de producción, el aislado de BGYMV identificado muestra una baja variabilidad molecular con respecto al aislado informado en el 2001 (Echemendía y col., 2001). Esta baja variabilidad molecular detectada confirma la estabilidad del BGYMV lo que valida los métodos de diagnóstico establecidos en el país para su detección.

La estrecha relación filogenética de las especies en estudio con Rhynchosia golden mosaic virus, Rhynchosia golden mosaic Havana virus y Macroptilium mosaic Puerto Rico virus, aislados de malezas fabáceas resalta nuevamente el papel de las plantas arvenses en la emergencia de nuevos begomovirus en el cultivo del frijol.

La emergencia de begomovirus en fabáceas ha sido informada en varios países de América Latina en los últimos años (Idris y col., 2003; Fiallo-Olivé y col., 2013; Martínez-Ayala y col., 2014) y puede deberse a la presencia de la especie *Middle East Asia Minor I* de *B. tabaci*, la cual se alimenta de un amplio rango de plantas y así tiene mayor probabilidad de adquirir y transmitir un alto número de begomovirus a nuevos hospedantes potenciales.

El incremento de poblaciones de mosca blanca se debe principalmente a las malas prácticas agrícolas por parte del hombre y al cambio climático, ya que un aumento de la temperatura conduce a cambios en la biología del vector, su distribución geográfica o cambios en la fenología que inciden en la supervivencia del virus, su movimiento y distribución; lo que desencadena la emergencia viral en nuevas áreas o nuevos cultivos (Canto y col., 2009; Hanssen y col., 2010).

Aunque todavía no se cuentan con datos sobre la biología de las dos nuevas especies de begomovirus identificados en el cultivo del frijol en Cuba, debe tenerse en cuenta la posibilidad de su capacidad para infectar otros cultivos tanto en Cuba como en otros países del Caribe.

Estos estudios evidencian la necesidad de mantener un estricto cumplimiento de las medidas para el control del complejo mosca blanca-geminivirus en cultivos de leguminosas en Cuba. Aún en períodos de baja frecuencia de aparición de infecciones, se debe tener en cuenta que el aumento de las mismas está sujeto a diferentes factores, tales como, nuevas fuentes de inóculo presentes en reservorios alternativos y los niveles de incidencia de la mosca blanca que necesitan ser controlados, además de la influencia de factores climáticos. Algunos autores han hecho referencia al hecho de que cuando se mantienen los campos libres del vector y su hospedante, y por tanto, libre de virus, fuera de la época de siembra, seguidamente, se observa una baja incidencia de virus en estas áreas cuando se destinan a la producción (Salati y col., 2002), lo que sugiere la necesidad de un buen manejo agronómico durante todo el año en las mismas.

Por otra parte, entre las medidas de control, también es necesaria la introducción de cultivares resistentes. En Cuba los programas de mejoramiento del frijol desde finales de los años 90 e inicio del nuevo siglo, trabajaron por la incorporación de genes de resistencia al begomovirus BGYMV en cultivares nacionales (Echemendía y col., 2012). Esto permitió disminuir su incidencia en campo y por tanto disminuir las pérdidas, sin embargo el incremento de los síntomas observados en los últimos años y los resultados de este trabajo confirman la necesidad de que los programas de

mejoramiento del cultivo del frijol incorporen, además del BGYMV, estas nuevas especies dentro de sus estrategias de obtención y evaluación de cultivares.

5.8 Bibliografía consultada

1. Albuquerque, L. C., Martin, D. P., Ávila, A. C., Inoue-Nagata, A. K. 2010. Characterization of tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. *Virus Genes* 40:140–147.
2. Bird, J., Sanchez, J., Rodriguez, R. L., Juliá, F. J. 1975. Rugaceous (whitefly-transmitted) viruses in Puerto Rico. *Tropical Diseases of Legumes*, 3-25.
3. Blanco, N., Lastres, N., Bencomo, I. 1984. Incidencia de las enfermedades virosas del frijol en Cuba. *Ciencia Agrícola* 19:21–32.
4. Brown, J.K., Idris, A.M., 2009. A new, virulent, broad host range bean-infecting begomovirus from Puerto Rico: Rhynchosia mild mosaic virus. *Annu Rep Bean Improv Coop* 52:30
5. Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R.W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., 2015. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of virology* 160, 1593-1619.
6. Canto T, Aranda MA, Fereres A. 2009. Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Global Change Biol.* 15:1884–94
7. Cordero, M., Ramos, P. L., Hernández, L., Fernández, A. I., Echemendía, A. L., Peral, R., González, G., García, D., Valdés, S., Estévez, A., Hernández, K. 2003. Identification of Tomato mottle Taino begomovirus strains in Cuban potato fields. *Phytoparasitica* 31:478-489.
8. Costa, A. S., & Bennett, C. W. 1950. White-fly-transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology*, 40(3): 266-83.
9. Domínguez, M., Ramos, P. L., Sanchez, Y., Crespo, J., Andino, V., Pujol, M., Borroto, C. 2009. Tobacco mottle leaf curl virus, a new begomovirus infecting tobacco in Cuba. *Plant Pathology* 58:786.

10. Echemendía, A., Ramos, P., Peral, R., Fuentes, A., González, G., Sanpedro, J., Morales, F., 2001. Cuban isolate of Bean golden yellow mosaic virus is a Member of the Mesoamerican BGYMV Group. *Plant Disease* 85, 1030-1030.
11. Echemendía, A. L., Ramos, P. L., Díaz, L., Fuentes, A., Pujol, M., González, G. 2004. First report of Sida golden yellow vein virus infecting *Sida* species in Cuba. *Plant Pathology* 53:234.
12. Echemendía Gómez AL, Ramos González PL, Peral Pérez R, Porras González ÁC, González Arias GA. Selección de genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV) por hibridación de ácidos nucleicos. *Fitosanidad*. 2012;11(4):3-11.
13. Fiallo-Olivé, E., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Martínez-Zubiaur, Y., 2010. Two novel begomoviruses belonging to different lineages infecting *Rhynchosia minima*. *Archives of Virology* 155, 2053-2058.
14. Fiallo-Olivé, E., Rivera-Bustamante, R. F., & Martínez-Zubiaur, Y. 2010. First report of tobacco as a natural host of Euphorbia mosaic virus in Cuba. *Plant Pathology*, 59(4), 795-795.
15. Fiallo-Olivé, E., Márquez-Martín, B., Hassan, I., Chirinos, D. T., Geraud-Pouey, F., Navas-Castillo, J., & Moriones, E. (2013). Complete genome sequences of two novel begomoviruses infecting common bean in Venezuela. *Archives of virology*, 158(3), 723-727.
16. Fondong, V.N., 2013. Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology* 14, 635-649.
17. Hanssen, I M., Lapidot, M., Thomma B. 2010. Emerging viral disease of tomato crops. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 23:539-48.
18. Hernández-Zepeda, C., Brown, J. K., Moreno-Valenzuela, O. A., Argüello-Astorga, G., Idris, A. M., Carnevali, G., & Rivera-Bustamante, R. F. 2010. Characterization of Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus, a new recombinant begomovirus associated with two fabaceous weeds in Yucatan, Mexico. *Archives of virology*, 155(10), 1571-1579.

19. Idris, A., Hiebert, E., Bird, J., Brown, J., 2003. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. *Phytopathology* 93, 774-783.
20. Leyva, R.M., Quiñones, M., Acosta, K.I., Piñol, B., Xavier, C.D., Zerbini, F.M., 2016. First report of Tobacco leaf curl Cuba virus infecting common bean in Cuba. *New Disease Reports* 33.
21. Maqueira-López, L. A., la-Noval, W. T. D., Roján-Herrera, O., Pérez-Mesa, S. A., & Toledo, D. 2016. Respuesta del crecimiento y rendimiento de cuatro cultivares de soya *Glycine max.*(L.) Merrill) durante la época de frío en la localidad de Los Palacios. *Cultivos Tropicales*, 37(4), 98-104.
22. Martínez-Ayala, A., Sánchez-Campos, S., Cáceres, F., Aragón-Caballero, L., Navas-Castillo, J., & Moriones, E. 2014. Characterisation and genetic diversity of pepper leafroll virus, a new bipartite begomovirus infecting pepper, bean and tomato in Peru. *Annals of applied biology*, 164(1), 62-72.
23. Martínez Zubiaur, Y., De Blas, C., Quiñones, M., Castellanos, C., Peralta, E. L., & Romero, J. 1998. Havana tomato virus, a new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Cuba. *Archives of virology*, 143(9), 1757-1772.
24. Martínez Zubiaur, Y., Quiñones, M., Fonseca, D., Potter, J., Maxwell, D., 2002. First report of Tomato yellow leaf curl virus associated with beans, *Phaseolus vulgaris*, in Cuba. *Plant Disease* 86, 814-814.
25. Martínez, Y., Muñiz, Y. Quinones, M. 2006a. A new begomovirus infecting pepper plants in Cuba. *Plant Disease* 13:17.
26. Martínez, Y., Quiñones, M., Palenzuela, I., Muñiz, Y. 2006b. Diversidad de begomovirus presentes en Cuba. *Revista Protección Vegetal* 21:149-154
27. Mather D, Bernsten R, Rosas J, Ruano AV, Escoto D. The economic impact of bean disease resistance research in Honduras. *Agricultural Economics*. 2003;29(3):343-52.
28. Morán, J. M., Ramos, P. L., Dominguez, M., Fuentes, A. D., Sánchez, Y., Crespo, J., Andino, V. 2006. Tobacco leaf curl Cuba virus, a new begomovirus infecting tobacco (*Nicotiana tabacum*) in Cuba. *Plant Disease* 86:1050.

29. Morales F. Whiteflies as vectors of viruses in legume and vegetable mixed cropping systems in the tropical lowlands of Central America, Mexico and the Caribbean. In: Anderson, PK, Morales FJ (eds.) Whitefly and whitefly-borne viruses in the tropics: building a knowledge base for global action, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, p. 173–176. (CIAT publication no. 341). 2005.
30. Morales, F. 2010 Distribution and dissemination of begomoviruses in Latin America and the Caribbean. En Stansly, P.A y Naranjo, S. E. (eds). *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*, Springer.
31. Muhire, B.M., Varsani, A., Martin, D.P., 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. PLoS ONE 9, e108277.
32. Muñiz, Y; Martínez, Y; Martínez, M; Fonseca, D; Granier, M; Peterschmitt, M. 2006. Caracterización molecular de poblaciones cubanas de *Bemisia tabaci* (Gennadius). Revista de Protección Vegetal. 21(3):163-169.
33. Muñiz, Y; Granier, M; Caruth, C; Umaharan, P; Marchal, C; Pavis, C. 2011. Extensive settlement of the invasive MEAM1 population of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in the Caribbean and rare detection of indigenous populations. Environmental entomology.;40(5):989-98.
34. Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., & Sánchez-Campos, S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. Annual review of phytopathology, 49, 219-248.
35. Permingeat, H.R., Romagnoli, M.V., Vallejos, R.H., 1998. A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. Plant Mol Biol Rep 16, 1-6.
36. Ramos, P. L., Guerra, O., Peral, R., Oramas, P., Guevara, R. G., & Rivera-Bustamante, R. 1997. Taino tomato mottle virus, a new bipartite geminivirus from Cuba. Plant Disease, 81(9), 1095-1095.
37. Rana, V. S., Popli, S., Saurav, G. K., Raina, H. S., Chaubey, R., Ramamurthy, V. V., & Rajagopal, R. (2016). A *Bemisia tabaci* midgut protein interacts with begomoviruses and plays a role in virus transmission. Cellular microbiology, 18(5), 663-678.

38. Salati, R.; Nahkla, M.K.; Rojas, M.R.; Guzman, P.; Jaquez, J.; Maxwell, D.P. y Gilbertson, R.L. 2002. Tomato yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: Characterization of an infectious clone virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Virology*. 92(5): 487-496.
39. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, mst197.
40. Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, A. & Martin, D. P. 2017. *Capulavirus* and *Grablovirus*: two new genera in the family *Geminiviridae*. *Archives of Virology*, 162(6), 1819-1831.
41. Zerbini, F.M.; Briddon, R.W.; Idris, A., Martin, D.P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-Bustamante, R., Roumagnac, P., Varsani, A., and ICTV Report Consortium. 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*, *Journal of General Virology*, 98:131-133.