

CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO AMARILLO DORADO DEL FRIJOL EN CUBA

Ana Lidia Echemendía Gómez,¹ Pedro L. Ramos González,² Natalia Villarreal,³ Ana Karina Martínez,³ G. González Arias¹ y F. J. Morales³

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, Ciudad de La Habana, C. P. 11600, aechemendia@inisav.cu

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Avenida 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa. Apdo. 6162, Ciudad de La Habana, C. P. 10600

³ Centro Internacional de Agricultura Tropical. Apartado aéreo 6713, Cali, Colombia

RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es originario de América, donde se considera un alimento básico. Desde la década de los setenta del pasado siglo la emergencia del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en plantaciones de frijol común en Cuba está asociada con altas poblaciones de *Bemisia tabaci*. De acuerdo con estas infecciones persistentes y las pérdidas causadas por el virus, los objetivos de este trabajo se encaminaron a la caracterización biológica, serológica y molecular de los aislados cubanos de BGYMV procedentes de varias provincias del país. Para la caracterización se usaron métodos biológicos, inmunoenzimáticos y moleculares. Las secuencias totales y parciales obtenidas se compararon con los aislados de BGYMV informados en la región y disponibles en el banco de genes. Los síntomas de amarillamiento característicos fueron reproducidos por inoculación mecánica. Los aislados cubanos, cuando se usó el método ELISA, reaccionaron eficientemente con el anticuerpo monoclonal 3F7, pero no con 2G5. El análisis por RFLP de los fragmentos clonados de 1,2 y 1,4 kb reveló patrones de restricción similares para los aislados de diez provincias, pero diferentes a los patrones de aislados de la región. Las secuencias nucleotídicas y aminoácidas del aislado cubano de BGYMV mostró los mejores porcentajes de identidad al compararlo con el aislado de la Florida de este virus. En la región común de los aislados cubanos se identificó la secuencia iterativa ATGGAG. La caracterización biológica, serológica y molecular del geminivirus reveló que el aislado cubano del BGYMV es miembro del grupo mesoamericano del BGYMV.

Palabras claves: begomovirus, BGYMV, frijol común, caracterización

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) has its origin in America, where it is considered as one of the basic foods. In Cuba, the emergence of bean golden mosaic was associated with high populations of *Bemisia tabaci* in common bean plantings in the 1970s. Persistent infections and crop losses caused by the virus have been reported. With these considerations, the objectives of this work were dedicated to the biological, serological and molecular characterization of the Cuban isolates of BGYMV. Biological, immunoenzymatic and molecular methods were used for the characterization. Characteristic yellowing symptoms were reproduced using manual inoculation and in ELISA test, Cuban isolates of BGYMV reacted efficiently with 3F7 monoclonal antibody but not with 2G5. Fragment length polymorphism analysis of 1.2 and 1.4 kb cloned fragments revealed similar patterns for isolates from ten provinces. However, they differ from other isolates of the region. The nucleotide and amino acid sequence from Cuban isolates shared the best percentage of identity with the Florida isolate. The iterative sequence ATGGAG was identified in the common region of the Cuban BGYMV isolates. Furthermore, the biological, serological and molecular characterization showed that isolate of BGYMV is a member of the Mesoamerican BGYMV group.

Keywords: begomovirus, BGYMV, common bean, characterization

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es originario de América, donde se considera uno de los alimentos básicos, ya que representa un aporte proteico y calórico del 15-30% y 340 cal/100 g, respectivamente. En Cuba se cultivan aproximadamente 52 000 ha de frijol, sin incluir las áreas dedicadas al autoabastecimiento. La producción estatal solamente cubre el 5% de la demanda, lo que exige la importación de 120 000 t anuales de este grano, equivalente a 40 millones de dólares. En la re-

gión, la baja productividad del frijol se debe a diversos factores, entre los que se encuentran la falta de asistencia técnica, el bajo uso de insumos dedicados a la atención del cultivo y los problemas fitosanitarios. Entre estos últimos los que más se destacan son las enfermedades virales transmitidas por moscas blancas [Morales, 2000].

La enfermedad viral de mayor importancia causada por begomovirus que afecta al frijol en América Latina es

el mosaico dorado del frijol (BGYMV), señalado por primera vez en Brasil [Costa, 1965], el que se diseminó a regiones productoras de Argentina y Bolivia, donde alcanzó valores de incidencia del 80% y pérdidas entre el 40-100%, y se convirtió en la década de los ochenta en la enfermedad más devastadora del cultivo de todos los tiempos [Morales, 2000].

Desde inicios de la década de los setenta del pasado siglo fueron señalados en Cuba los síntomas de amarillamiento en el frijol como causados por el mosaico dorado del frijol [Blanco y Bencomo, 1978], asociado a poblaciones de moscas blancas. Este virus provocó, en las campañas de los años 1989-1990 y 1990-1991, porcentajes máximos de infección en las varias provincias, lo que conllevó la destrucción de más de 1000 ha del cultivo. Posteriormente, con la presencia del biotipo B de *Bemisia tabaci* (Gennadius), a finales de la década de los noventa, la enfermedad alcanzó afectaciones del 90% y se convirtió en el principal patógeno viral del frijol común en el país [Blanco y Faure, 1994; Vázquez, 1999].

Los estudios hasta la actualidad en Cuba y relacionados con este virus se basaron en aspectos epidemiológicos [Blanco y Bencomo, 1978; Blanco *et al.*, 1984], sin existir referencias sobre caracterización y métodos de diagnóstico para su detección. Por otra parte, las medidas que se han implementado en la región para proteger al cultivo de enfermedades virales se han basado en la utilización de variedades mejoradas genéticamente con resistencia a mosaico dorado, la aplicación de plaguicidas para reducir los niveles del insecto vector y la implantación de los manejos integrales [Morales y Singh, 1993; Beebe *et al.*, 1995; Murguido, 2000].

De acuerdo con lo antes expuesto, los objetivos del trabajo se encaminaron a caracterizar la especie de begomovirus que produce síntomas de mosaico dorado en el cultivo del frijol, y aplicar métodos para su diagnóstico mediante técnicas biológicas, serológicas y moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta de las plantas con síntomas se realizó en cuatro campañas del cultivo (1999-2004) y abarcó diferentes municipios de las provincias de Pinar del Río, Ciudad de La Habana, La Habana, Matanzas, Cienfuegos, Villa Clara, Holguín, Granma, Santiago de Cuba y Guantánamo. Se analizó un total de 398 plantas de frijol, las que manifestaban síntomas similares a los causa-

dos por begomovirus, que fueron debidamente registradas y conservadas a -20°C hasta su posterior análisis.

Se realizaron inoculaciones mecánicas por maceración de tejidos a diferentes variedades de frijol, se utilizó como inóculos la savia de hojas de frijol con síntomas similares a begomovirus y colectadas en diferentes provincias. Cada aislado se inoculó a 15 plantas de *P. vulgaris* variedad Delicias 364. Los fragmentos de hojas de frijol se maceraron con tampón fosfato 0,1 M pH 7,5 [Schwartz y Gálvez, 1990]. Las plantas permanecieron en condiciones controladas de temperatura a $28-30^{\circ}\text{C}$ y se observaron durante 30 días.

Como técnica inmunoenzimática se desarrolló el método ELISA-DAS, para lo que se emplearon los anticuerpos 2G5 y 3F7, según lo recomendado por Cancino *et al.* (1995).

La extracción de ADN viral de plantas se llevó a cabo por el método Dellaporta *et al.* (1983). La amplificación se realizó con los pares de oligonucleótidos degenerados PAL1v1978-PAR1c715 y PAL1c1960-PAR1v722, y las condiciones empleadas se adecuaron a las informadas por Rojas *et al.* (1993). Los fragmentos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio a 0,5 mg/mL [Sambrook *et al.*, 1989].

Los fragmentos amplificados por PCR se aislaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pZeroTM-2.1 en el sitio de corte único *Pst*I, y las técnicas de ADN recombinante se efectuaron según Sambrook *et al.* (1989). El análisis de restricción se realizó con diferentes enzimas, y se tuvieron en cuenta las secuencias disponibles en el banco de genes y el fragmento amplificado.

Para determinar la secuencia parcial de cada aislado se seleccionaron al menos dos clones por muestra de las provincias de Pinar del Río, Ciudad de La Habana, La Habana, Matanzas, Cienfuegos, Villa Clara, Holguín, Granma y Santiago de Cuba, y además se obtuvo la secuenciación completa del componente A del aislado de Holguín. Los clones seleccionados fueron los amplificados con el par de oligonucleótidos PAL1v1978-PAR1c715. La secuenciación del ADN se realizó por el método de terminación de cadenas por dideoxynucleótidos por medio de un secuenciador automático ALFwin Sequense Analyser 2.00.

Las secuencias totales y parciales obtenidas se compararon con los aislados de BGYMV informados en la región y disponibles en el banco de genes. Para los análisis de secuencia se utilizaron los paquetes de *software* Gene Runner versión 3.02 (1994). La búsqueda de secuencias relacionadas se realizó con el programa BLAST (NCBI), y los alineamientos múltiples de secuencias por el Clustal W (EMBL) [Thompson *et al.*, 1994]. Las secuencias informadas se adquirieron de la base de datos EMBL y GenBank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las pruebas de transmisión mecánica a *P. vulgaris* realizadas a partir de muestras de frijol colectadas en las diferentes localidades del país resultaron positivas, y se observaron inicialmente síntomas de encrepamiento foliar y un posterior desarrollo de un mosaico amarillo intenso muy similar al producido por el virus del mosaico dorado del frijol (*Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV)). En los resultados preliminares se asumió que la sintomatología objeto de análisis es causada por el BGYMV, especie mesoamericana, debido a que en el cultivo se distinguen dos especies del virus que causan el síntoma de mosaico dorado: la suramericana, denominada *Bean golden mosaic virus* (BGMV), y la mesoamericana, nombrada *Bean golden yellow mosaic virus*. La primera se transmite solo por moscas blancas y está distribuida en los países de Brasil, Argentina y Bolivia, mientras que la mesoamericana por moscas blancas y por vía mecánica, y se encuentra en República Dominicana, Nicaragua, Costa Rica, Puerto Rico, Haití y México [Morales, 2000; Morales *et al.*, 2005].

Los aislados colectados de las muestras de frijol resultaron positivos al enfrentarse al anticuerpo 3F7 de amplio espectro de acción; sin embargo, el anticuerpo específico 2G5 para identificar los aislados de BGYMV no reconoció a los posibles aislamientos cubanos de BGYMV.

Cancino *et al.* (1995) refirieron que el anticuerpo monoclonal 3F7 reconoció a diferentes begomovirus transmitidos por moscas blancas, como los aislamientos de BGYMV de Puerto Rico, Florida, Guatemala y República Dominicana, y otros no relacionados como el *Euphorbia mosaic virus* (EMV) y el *Tomato mottle virus* (TMoV), mientras que 2G5 reaccionó solamente con los aislados de BGYMV de

Guatemala, República Dominicana y Puerto Rico. La diferente reactividad de este anticuerpo condujo a los autores a analizar algunos cambios que observaron en la secuencia aminoacídica del gen de la proteína de la capsida (CP), al compararla con aislados de otros begomovirus. Al mismo tiempo señalan que diferencias en la estructura primaria de la CP pueden tener importancia para identificar los epitopes responsables de la especificidad de este anticuerpo. Al hacer la comparación de la secuencia aa de la CP del aislado cubano con los restantes aislados de este virus en la región, reveló dos cambios en los residuos aa en las posiciones 10 (glutamina) y 27 (serina) con respecto a los aislados, lo que pudiera explicar la diferente reactividad del anticuerpo 2G5 con el aislado cubano de BGYMV.

Los resultados en este estudio corroboraron la utilidad del anticuerpo 3F7, al reaccionar con todas las muestras analizadas, lo que permite asumir que se está en presencia de un begomovirus bipartito transmitido por moscas blancas, mientras que los resultados con 2G5 demuestran que los posibles aislamientos de Cuba del BGYMV no son reconocidos por este, y que coincide con lo señalado para los aislados de este virus presentes en la Florida y en otras localidades de Cuba [Blair *et al.*, 1995; Morales *et al.*, 2005].

Mediante la técnica de PCR, en la que se emplearon oligonucleótidos degenerados PAL1v1978-PAR1c715 y PAL1c1960-PAR1v722, se amplificaron fragmentos de 1,4 y 1,2 kb, respectivamente, que corresponden al componente ADN-A del BGYMV [Rojas *et al.*, 1993] a partir de las muestras de frijol analizadas.

Para cada una de las muestras de frijol de las diferentes localidades en estudio se lograron seis clones recombinantes que se utilizaron para los posteriores análisis por RFLP y su secuenciación. La amplificación de ADN por PCR y el análisis de restricción por RFLP están descritos para la identificación y diferenciación de especies de begomovirus [Rojas *et al.*, 1993]. Los resultados indican que al comparar los patrones de restricción para los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos PAL1v1978-PAR1c715 de los aislados de BGYMV de la región, con los presentes en Cuba, no se observaron diferencias al digerir con las enzimas *SalI* y *BgIII*, y se obtuvieron dos fragmentos: uno de 1,1 kb y otro de 0,3 kb (*Fig. 1*).

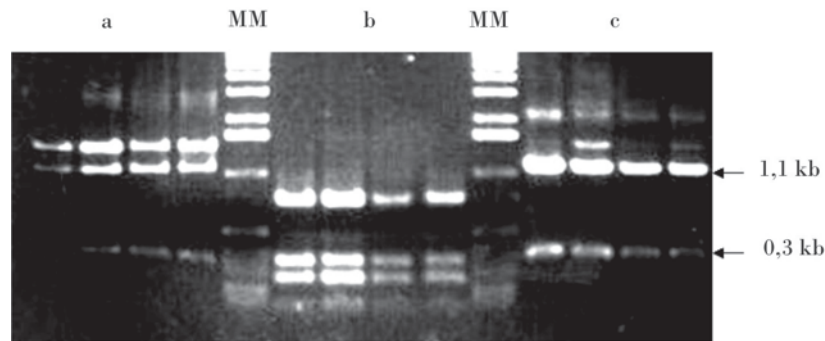


Figura 1. Patrón de restricción obtenido con (a) *SalI*, (b) *HincII* y (c) *BglII* para el fragmento amplificado con PAL1v1978-PAR1c715. Aislados de Pinar del Río (líneas 1, 6, 11), Villa Clara (2, 7, 12), Holguín (3, 8, 13) y Guantánamo (4, 9, 14). MM: Marcador de peso molecular 1 kb.

Para el resto de las enzimas (*HindIII*, *NdeI*, *HincII*, *EcoRV*) el patrón de restricción fue diferente al compararlo con los aislados de BGYMV, de manera que se encontró que el sitio *HindIII*, conservado en todos los aislados de BGYMV de la región no estaba en ninguno de los clones de las diferentes localidades estudiadas. Estos clones tampoco presentaron el sitio *EcoRV* similar a lo comprobado para el aislado de BGYMV-GA, mientras que para la enzima *NdeI* los aislados cubanos solo poseían un sitio en vez de dos, y para *HincII* cuatro sitios en vez de tres, al compararlos con lo señalado para los aislados mesoamericanos; sin embargo, para los fragmen-

tos amplificados con los oligonucleótidos PAL1c1960-PAR1v722 no se observaron diferencias entre los aislados cubanos del BGYMV y los de la región, al digerir con las enzimas de restricción *HincII*, *SalI* y *KpnI*, que mostraron un sitio único para cada caso, mientras que para el resto de las enzimas probadas (*ClaI*, *NdeI*, *HindIII*, *EcoRI*, y *ScaI*) el patrón fue distinto. Con la enzima *HindIII* se observaron dos patrones de restricción: uno con un sitio único y otro de dos sitios. Se encontraron además poblaciones de BGYMV en algunas localidades donde los individuos con diferentes patrones de restricción estaban mezclados (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Análisis de restricción realizado a los fragmentos amplificados por PCR con el par de oligonucleótidos PAL1v1978-PAR1c715 de los aislados de BGYMV. Los números muestran el número de sitios de restricción encontrados para cada enzima

Aislado de BGYMV	<i>HindIII</i>	<i>HincII</i>	<i>NdeI</i>	<i>Sal I</i>	<i>Bgl II</i>	<i>EcoRV</i>
México	1	3	2	1	1	1
Guatemala	2	3	3	1	1	0
República Dominicana	1	3	2	1	1	1
Puerto Rico-J	1	3	2	1	1	1
Puerto Rico	1	3	2	1	1	1
Florida	0	4	1	1	1	0
Pinar del Río	0	4	1	1	1	0
Ciudad de La Habana	0	4	1	1	1	0
La Habana	0	4	1	1	1	0
Matanzas	0	4	1	1	1	0
Cienfuegos	0	4	1	1	1	0
Villa Clara	0	4	1	1	1	0
Holguín	0	4	1	1	1	0
Santiago de Cuba	0	4	1	1	1	0
Granma	0	4	1	1	1	0

Tabla 2. Análisis de restricción realizado a los fragmentos amplificados por PCR con el par de oligonucleótidos PAL1c1960-PAR1v722 de los aislados de BGYMV analizados

<i>Aislado de BGYMV</i>	<i>ClaI</i>	<i>NdeI</i>	<i>HindIII</i>	<i>KpnI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>ScaI</i>
México	1	2	2*	1	1	1
Guatemala	1	1*	2*	1	1	1
República Dominicana	1	2	2*	1	1	1
Puerto Rico-J	1	2	1	1	1	1
Puerto Rico	1	2	1	1	1	1
Florida	2	1	1	1	1	0
Pinar del Río	2	1	2/1	1	1	0
Ciudad de La Habana	2	1	1	1	1	0
La Habana	2	1	2	1	1	0
Matanzas	2	1	2/1	1	1	0
Cienfuegos	2	1	2	1	1	0
Villa Clara	2	1	1	1	1	0
Holguín	2	1	1	1	0	0
Santiago de Cuba	2	1	1	1	1	0
Granma	2	1	2/1	1	1	0

* Indican patrones diferentes en caso de números iguales.

El análisis de los patrones de restricción para los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos PAL1v1978-PAR1c715 de los aislados de BGYMV en Cuba mostró homología en todos los clones analizados. Resultados divergentes se encontraron cuando se ensayó el RFLP con los oligonucleótidos PAL1c1960-PAR1v722. Se encontró una población de virus con cambios en el patrón de restricción para la enzima *HindIII*. Los estudios han mostrado que la mayoría de los cambios en el patrón de restricción de los posibles aislados cubanos se corresponden con el extremo 5' del gen de la CP, lo que coincide con lo expresado por considerar el extremo más variable del gen que codifica para esta proteína [Padidam *et al.*, 1995]. Estos estudios permitieron realizar por primera vez en el país la caracterización biológica y serológica del aislado cubano del BGYMV en diferentes provincias [Echemendía *et al.*, 2001; Echemendía, 2004].

Al comparar las secuencias de nucleótidos y aminoácidos entre el aislado cubano procedente de plantas de frijol de la provincia de Holguín con los del BGYMV de otros países y otros begomovirus, los mayores porcentajes de identidad se observaron con el aislado del BGYMV de México y la Florida.

Mediante el alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica del componente A, de los fragmentos am-

plificados con el par de oligonucleótido PAL1v1978-PAR1c715, de los aislados del BGYMV cubanos y de la región, se observó la alta similitud existente entre ellos (Tabla 3). Además, al alinear las secuencias de la región común (CR) del aislado de BGYMV CU con los de la región, se reveló la similitud de los iterones (TGGAG) y la alta identidad entre las secuencias. Por otra parte, los porcentajes de identidad obtenidos al comparar los aislados de BGYMV de Pinar del Río, Matanzas, Villa Clara, Holguín y Santiago de Cuba con los aislados de la región, están en un rango del 94,7 y 97,0%, y los valores más altos correspondieron con el aislado de Estados Unidos BGYMV-[US:Hom:05], descrito inicialmente en la Florida, lo que muestra que el aislado de BGYMV cubano es una raza del grupo mesoamericano de este virus [Echemendía *et al.*, 2001].

Tabla 3. Porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas de aislados de BGYMV de Centroamérica, el Caribe y Cuba

<i>Aislados</i>	<i>Número de acceso</i>	<i>Total (%)</i>
BGYMV- [US:Hom:05]	(DQ119824.1)	97,0
BGYMV- [MX:Chi]	(AF173555.1)	96,1
BGYMV- [GT:87]	(M91604.1)	95,3
BGYMV- [DO:87]	(L01635.1)	95,3
BGYMV- [PR]	(M10070.1)	94,7

Al comparar los aislados cubanos entre ellos, el rango de identidad osciló entre el 97,2 y 99,2%, lo que indica que la población de este virus en las localidades en estudio es muy homogénea, y existe poca diversidad genética del BGYMV en Cuba, al considerar lo establecido por el séptimo reporte del ICTV (Comité Internacional de Taxonomía de Virus) [Fauquet *et al.*, 2003; 2005; 2006; Stanley *et al.*, 2005]. Otros autores han desarrollado estudios para analizar la diversidad genética, y han recurrido al RFLP y la secuenciación parcial de especies de un mismo género [García-Arenal *et al.*, 2001; Willment *et al.*, 2001]. Los resultados permitieron secuenciar y caracterizar molecularmente por primera vez los aislados de BGYMV de Cuba, el que se denominó por el Comité Internacional de Taxonomía (ICTV) como BGYMV-[CU] [Fauquet *et al.*, 2006; 2008]. La secuencia completa del componente A del BGYMV de 2,644 pb se introdujo en el banco de genes de la base de datos EMBL, con el número de accesión AJ544531 [Echemendía *et al.*, 2001; Fauquet *et al.*, 2005]. Estos estudios aportaron nuevos conocimientos para incluirlos en la metodología de detección de begomovirus en el sistema nacional de sanidad vegetal y en el manual de manejo integrado de plagas del cultivo en Cuba.

CONCLUSIONES

- La caracterización serológica y molecular demostraron que el aislado cubano es una raza del BGYMV, por lo que se considera miembro del grupo mesoamericano de este virus, y se denominó BGYMV-[CU].
- La secuencia de nucleótidos de BGYMV-[CU] mostró los mejores valores de identidad con el aislado de Estados Unidos de este virus BGYMV-[US:Hom:05].

REFERENCIAS

Beebe, S. E.; I. Ochoa; P. Skroch; J. Nienhuis; J. Tivang: «Genetic Diversity Among Common Bean Breeding Lines Developed for Central America», *Crop Sci.* 35:1178-1183, EE. UU., 1995.

Blair, M. W.; M. J. Bassett; A. M. Abouzid; E. Heibert; J. E. Polton; R. T. McMillan; W. Graves; M. Lamberts: «Occurrence of Bean Golden Mosaic Virus in Florida», *Plant Dis.* 79:529-533, EE. UU., 1995.

Blanco, N.; I. Bencomo: «Afluencia de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), vector del virus del mosaico dorado en plantaciones de frijol», *Ciencias de la Agricultura* 2:39-46, Cuba, 1978.

Blanco, N.; N. Lastres; I. Bencomo: «Incidencia de enfermedades virósicas del frijol en Cuba», *Ciencias de la Agricultura* 19:21-22, Cuba, 1984.

Blanco, N.; B. Faure: «Situación actual del mosaico dorado del frijol en el Caribe, Cuba», *El mosaico dorado del frijol, avances de investigación*, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 1994, pp. 82-89.

Cancino, M.; A. M. Abouzid; F. J. Morales; D. E. Purcifull; J. E. Polston; E. Heibert: «Generation and Characterization of Three Monoclonal Antibodies Useful in Detecting and Distinguishing Bean Golden Mosaic Virus Isolate», *Phytopathology* 85:484-490, EE. UU., 1995.

Costa, A. S.: «Three Whitefly-Transmitted Virus Diseases of Beans in São Paulo, Brazil», *FAO Plant Protection Bull.* 13 (6):1-12, 1965.

Dellaporta, S. L.; J. Y. Wood; J. B. Hicks: «A Plant DNA Miniprep: Version II», *Plant Mol. Biol. Rep.* 1.4:19-21, Inglaterra, 1983.

Echemendía, A. L.; P. L. Ramos; R. Peral; A. Fuentes; G. González; J. Sanpedro; F. J. Morales: «Cuban isolate of *Bean golden yellow mosaic virus* is a Member of the Mesoamerican BGYMV Group», *Plant Disease* 85: 1030. EE.UU. 2001.

Echemendía, A. L.: «Caracterización y diagnóstico de *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) en Cuba», Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Las Villas, Cuba, 2004.

Fauquet, C. M.; J. B. Bisaro; R. W. Briddon; J. K. Brown; B. D. Harrison; E. P. Rybicki; D. C. Stenger; J. Stanley: «Revision of Taxonomic Criteria for Species Demarcation in the Family Geminiviridae, and an Updated List of Begomovirus Species», *Arch. Virology* 148:405-421, EE. UU., 2003.

Fauquet, C. M.; J. Stanley: «Revising the Way We Conceive and Name Viruses Below the Species Level: A Review of Geminiviruses Taxonomy Calls for New Standardized Isolate Descriptors», *Archive of Virology* 150:2151-2179, EE. UU., 2005.

Fauquet, C. M.; R. W. Briddon; J. K. Brown; E. Moriones; J. Stanley; M. Zerbini; X. Zhou: «Geminivirus Strain Demarcation and Nomenclature», www.danforthcenter.org/iltab (revisado en octubre del 2006).

—: «Geminivirus Strain Demarcation And Nomenclature», *Archive of Virology* 153 (4):783-821. EE. UU., 2008.

García-Arenal, F.; A. Fraile; J. M. Malpica: «Variability and Genetic Structure of Plant Virus Populations», *Annu. Rev. Phytopathology* 39:157-86, EE. UU., 2001.

Morales, F. J.: *El mosaico dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en América Latina*, Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia. 2000.

Morales, F. J.; S. P. Singh: «Breeding for Resistance to Bean Golden Mosaic Virus in an Interracial Populations of *Phaseolus vulgaris*. L.», *Euphytica* 67:59-63, Holanda, 1993.

Morales, F. J.; G. González; C. Murguido; A. L. Echemendía; Y. Martínez; Y. Hernández; B. Faure; M. Chailloux: «Whitefly and Whitefly-Borne Viruses in the Tropics: Building a Knowledge Base for Global Action», Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 2005, pp. 230-236.

Murguido, C. A.: «Manual sobre manejo integrado de plagas, enfermedades y malezas en el cultivo del frijol», Inisav, Ministerio de la Agricultura, La Habana, 2000.

Padidam, M.; R. N. Beachy; C. M. Fauquet: «Classification and Identification of Geminiviruses Using Sequence Comparisons», *J. of Gen. Virology* 76:249-263, Inglaterra, 1995.

Rojas, M. R.; R. L. Gilbertson; D. R. Russell; D. P. Maxwell: «Use of Degenerate Primers in the Polimerasa Chain Reaction to Detect Whitefly Transmitted Geminiviruses», *Plant Disease* 77:340-347, EE. UU., 1993.

Sambrook, J.; E. F. Fritsch; T. Maniatis: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Capítulo 14: «*In vitro* Amplification of DNA by the Polymerase Reaction», 2nd ed., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, pp. 14.1-14.35.

Schwartz, H. F.; G. E. Gálvez: *Diseases, Insects, Soil and Climatic Constraints of Phaseolus vulgaris. Bean Production Problem*, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 1990, pp. 265-274.

Caracterización del virus del mosaico amarillo...

- Stanley, J.; D. M. Bisaro; R. W. Briddon; J. K. Brown; C. M. Fauquet; B. D. Harrison; E. P. Rybicki; D. C. Stenger: *Geminiviridae. In Virus taxonomy, VIII Report of ICTV, 301-326*, Elsevier Academic Press, Londres, 2005.
- Thompson, J. D.; D. G. Higgins; T. J. Gibson: «Clustal W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Positions-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice», *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680, EE. UU., 1994.
- Vázquez, L. L.: «Caracterización del polimorfismo de la mosca blanca *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring (Homoptera: Aleyrodidae)», *Fitosanidad* 3 (2):21-23, La Habana, 1999.
- Willment, J. A.; D. P. Martin; E. P. Rybicki: «Analysis of the Diversity of African Streak Mastreviruses Using PCR-Generated RFLPs and Partial Sequence Data», *J. of Virological Methods* 93:75-87, EE. UU., 2001.